

Rec'd PCT/PTO 24 MAR 2005
PCT/KR 03/02081
RO/KR 09 10 2003
10/529169

REC'D 27 OCT 2003

WIPO PCT



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Intellectual
Property Office.

출원 번호 : 10-2002-0061589
Application Number

출원 년 월 일 : 2002년 10월 09일
Date of Application OCT 09, 2002

출원 인 : (주)씨아이디
Applicant(s) CID co., Ltd.

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)



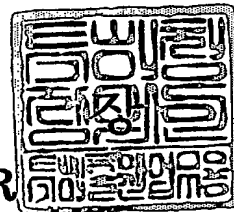
2003 년 10 월 09 일

특

허

청

COMMISSIONER



【서지사항】

【서류명】	출원인 변경 신고서
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2003.06.28
【구명의인(양도인)】	
【성명】	이영민
【출원인코드】	4-2002-037468-5
【사건과의 관계】	출원인
【신명의인(양수인)】	
【명칭】	(주)씨아이디
【출원인코드】	1-2003-024813-1
【대리인】	
【성명】	이원희
【대리인코드】	9-1998-000385-9
【포괄위임등록번호】	2002-075574-2
【포괄위임등록번호】	2003-045068-9
【사건의 표시】	
【출원번호】	10-2002-0061589
【출원일자】	2002.10.09
【심사청구일자】	2002.10.09
【발명의 명칭】	일본뇌염 바이러스의 신규한 전체-길이의 게놈 RNA 및 상기 JEV 게놈 RNA에 대한 감염성이 있는 JEV cDNA
【변경원인】	전부양도
【취지】	특허법 제38조제4항·실용신안법 제20조·의장법 제 24조 및 상표법 제12조 제1항의 규정에 의하여 위와 같이 신고합니다. 대리인 이원희 (인)
【수수료】	13,000 원
【첨부서류】	1. 양도증_1통 2.인감증명서_1통

【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2002.10.09
【발명의 명칭】	일본뇌염 바이러스의 신규한 전체-길이의 게놈 RNA 및 상기 J E V 게놈 RNA에 대한 감염성이 있는 J E V cDNA
【발명의 영문명칭】	Novel full-length genomic RNA for Japanese encephalitis virus and infectious JEV cDNA therefrom
【출원인】	
【성명】	이영민
【출원인코드】	4-2002-037468-5
【대리인】	
【성명】	이원희
【대리인코드】	9-1998-000385-9
【포괄위임등록번호】	2002-075574-2
【발명자】	
【성명】	이영민
【출원인코드】	4-2002-037468-5
【발명자】	
【성명의 국문표기】	윤상임
【성명의 영문표기】	YUN, Sang-lm
【주민등록번호】	770825-2382711
【우편번호】	376-881
【주소】	충청북도 보은군 수한면 성리 90-17
【국적】	KR
【심사청구】	청구
【미생물기탁】	
【기탁기관명】	한국생명공학연구소 유전자은행
【수탁번호】	KCTC 10346BP
【수탁일자】	2002.10.02
【미생물기탁】	
【기탁기관명】	한국생명공학연구소 유전자은행
【수탁번호】	KCTC 10347BP

【수탁일자】 2002.10.02

【핵산염기 및 아미노산 서열목록】

【서열개수】 48

【서열목록의 전자파일】 첨부

【취지】 특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사를 청구합니다. 대리인
이원희 (인)

【수수료】

【기본출원료】	20 면	29,000 원
【가산출원료】	176 면	176,000 원
【우선권주장료】	0 건	0 원
【심사청구료】	27 항	973,000 원
【합계】	1,178,000 원	
【감면사유】	개인 (70%감면)	
【감면후 수수료】	353,400 원	
【첨부서류】	1. 요약서·명세서(도면)_1통 2. 미생물기탁증명서_2통	

【요약서】

【요약】

본 발명은 일본뇌염 바이러스(Japanese encephalitis virus, JEV)의 신규한 게놈 RNA 및 상기 JEV 게놈 RNA에 대한 감염성이 있는 JEV cDNA(infectious JEV cDNA)에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 서열번호 15로 기재되는 전체-길이(full-length)의 JEV 게놈 RNA 및 상기 JEV 게놈 RNA에 대한 감염성이 있는 JEV cDNA에 관한 것이다. 본 발명의 JEV 게놈 RNA 및 JEV 게놈 RNA에 대한 감염성이 있는 cDNA는 JEV 유전자를 동정하는 것뿐만 아니라, JEV의 복제(replication), 전사(transcription) 및 번역(translation)에 관련된 분자생물학적인 메카니즘의 연구에 사용될 수 있으며, 또한 일본 뇌염의 치료제, 치료용 또는 예방용 백신, 진단시약 및 진단용 기구 등의 개발에도 유용하게 사용될 수 있고, 아울러 이형 유전자의 발현 벡터로 사용될 수 있다.

【대표도】

도 3

【명세서】

【발명의 명칭】

일본뇌염 바이러스의 신규한 전체-길이의 게놈 RNA 및 상기 JEV 게놈 RNA에 대한 감염성이 있는 JEV cDNA{Novel full-length genomic RNA for Japanese encephalitis virus and infectious JEV cDNA therefrom}

【도면의 간단한 설명】

도 1은 일본뇌염 바이러스의 한국분리주 K87P39과 이로부터 분리된 큰 플라크를 형성하는 JEV 분리체(large-plaque forming JEV isolate) CNU/LP2를 비교한 것으로서, JEV에 mock-infected BHK-21 세포(Mock-infected), 혼합된 다양한 크기의 플라크들을 나타내는 JEV K87P39 한국분리주에 감염된 BHK-21 세포(K87P39-infected), 및 일정한 큰 플라크들을 나타내는 CNU/LP2에 감염된 BHK-21 세포(CNU/LP2-infected)에 대한 플라크 분석 결과(A), Vero 세포를 사용한 경우의 플라크 분석 결과(B) 및 염색된 JEV-특이적 단백질들(녹색형광)과 프로피디움 아이오다인(propidium iodine, 적색형광)으로 염색된 세포의 핵을 공초점현미경(confocal microscopy)으로 보여주는 사진으로, mock-infected BHK-21 세포 및 K87P39, CNU/LP2, 황열병 바이러스 YF17D(yellow fever virus 17D)에 감염된 BHK-21 세포를 보여주는 사진이다(C).

도 2의 A는 JEV의 5'-말단과 3'-말단을 제외한 전체 JEV 게놈 RNA를 나타내는 세 개의 중첩하는 cDNA 앰플리콘의 RT-PCR 증폭에 대한 개략도로써, RNA는 회색으로 cDNA는 검정색 평행선으로 나타내고, CNU/LP2 JEV 게놈 RNA(전체길이: 10,968 base pairs)를 도식적으로 윗부분

에 그렸으며, 세 개의 중첩하는 cDNA인 JVF(nt 1-3,865), JVM(nt 3,266-8,170), 및 JVR(nt 7,565-10,893)는 아랫부분에 나타내었다.

도 2의 B는 CNU/LP2 JEV 게놈 RNA의 3'-말단의 염기서열을 분석하기 위한 개략도로써, 5'-말단이 인산화(phosphorylation)되고 동시에 3'-말단이 막힌(blocked) 올리고뉴클레오타이드 T(Oligo T)를 T4 RNA 접합효소(ligase)를 사용하여 JEV 게놈 RNA의 3'-말단과 접합시킨 것이며, 접합된 RNA는 화살표로 표시된 프라이머를 사용하여 cDNA 합성과 PCR 증폭을 실시하였고, 증폭된 산물은 클로닝되어지고 염기서열을 밝히는 데 사용된다.

도 2의 C는 상기 JEV 게놈 RNA로부터 합성된 JEV-특이적 앰플리콘(amplicon)을 보여주는 전기영동 사진으로써, 첫째 사슬 cDNA는 올리고 T와 상보적 결합을 하는 올리고뉴클레오타이드 TR(oligonucleotide TR)를 사용하여 합성하였고 역전사반응은 Superscript II 역전사 효소를 첨가하거나(lane 1) 또는 첨가하지 않고(lane 2) 수행하였으며, 합성된 cDNA는 올리고뉴클레오타이드 TR과 프라이머 J35를 사용하여 증폭한 후 증폭된 JEV-특이적 앰플리콘은 1.2% 아가로스 젤(agarose gel)상에서 분리하여 EtBr(ethidium bromide)로 염색하였다.

도 2의 D는 CNU/LP2 JEV 게놈 RNA의 5'-말단의 염기서열을 분석하기 위한 개략도로써, JEV 게놈 RNA의 5'-말단에 있는 캡(cap) 구조를 먼저 TAP(tobacco acid pyrophosphatase) 효소로 제거한 다음 T4 RNA 접합효소로 자가-접합을 실행한 후 cDNA 합성과 PCR 증폭에 사용되며, 증폭된 산물은 클로닝되어지고 염기서열을 밝히는 데 사용된다.

도 2의 E는 상기 JEV 게놈 RNA로부터 합성된 JEV-특이적 앰플리콘을 보여주는 전기영동 사진으로써, 첫째 사슬 cDNA는 nt 215-232와 상보적결합을 하는 프라이머를 사용하여 합성하였으며, 역전사반응은 역전사 효소를 첨가하거나(lane 1) 또는 첨가하지 않고(lane 2) 수행하였다. 합성된 cDNA는 프라이머 J35와 nt 164-181과 상보적 결합을 하는 프라이머 J39를 사용하여 증폭하였으며, 증폭된 JEV-특이적 앰플리콘은 1.2% 아가로스 젤 상에서 분리하여 EtBr로 염색하였으며, 이때 M은 100 bp DNA 사다리 마커(ladder marker)로써 염기쌍으로 나타내었다.

도 3의 A는 세균 인공 염색체(bacterial artificial chromosome)인 pBeloBAC11에 전체-길이의 JEV cDNA를 클로닝하기 위한 개략도를 보여주는 것으로, 본 발명에서 합성된 전체-길이의 JEV cDNA를 cDNA의 양쪽 말단에 굵은 줄로 표시된 JEV 게놈의 5' NTR 및 3'NTR과 바이러스의 단백질로 도식화하여 모식도로 나타내었고, 5'-말단의 SP6 및 T7 프로모터의 전사 시작부위(transcription start)와 3'-말단의 런-오프 전사(run-off transcription)를 위한 유일한 제한효소자리를 각각 나타내었다.

도 3의 B는 JEV 게놈 RNA의 뉴클레오타이드 염기서열은 굵은 소문자의 이탤릭체로 나타내었으며, 4개의 SP6-유도된(SP6-driven) 전체-길이 JEV cDNA 주형의 5'-말단 및 3'-말단 염기서열을 나타내며, 도 3의 C는 4개의 T7-유도된(T7-driven) 전체-길이 JEV cDNA 주형의 5'-말단 및 3'-말단 염기서열을 나타낸다. SP6 또는 T7 RNA 폴리머라아제 런-오프 전사체를 합성하기 위해서 두 개의 SP6-유도된 (B, pBAC^{SP6}/JVFL/*Xho*I와 pBAC^{SP6}/JVFLx/*Xho*I)과 두 개의 T7-유도된 (C, pBAC^{T7}/JVFL/*Xho*I와 pBAC^{T7}/JVFLx/*Xho*I) JEV cDNA 주형은 *Xho*I 처리하여 바이러스와 연관되지 않은 3개의 CGA 뉴클레오타이드를 3'-말단에 선형화시킨다. 한 개의 SP6-유도된 (B, pBAC^{SP6}/JVFLx/*Xba*I) 및 한 개의 T7-유도된 (C, pBAC^{T7}/JVFLx/*Xba*I) JEV cDNA 주형은 *Xba*I 처리하여 바이러스와 연관되지 않은 4개의 CTAG 뉴클레오타이드를 3'-말단에 선형화시킨다. 또

한, *Xba*I-처리된 SP6-유도된 pBAC^{SP6}/*JVFLx/Xba*I과 *Xba*I-처리된 T7-유도된 pBAC^{T7}/*JVFLx/Xba*I의 JEV cDNA 3'-말단에 추가된 바이러스와 연관되지 않은 4개의 CTAG 뉴클레오타이드는 녹두 뉴클레아제(mung bean nuclease, MBN)에 의해서 제거됨으로써 pBAC^{SP6}/*JVFLx/Xba*I^{MBN}과 pBAC^{T7}/*JVFLx/Xba*I^{MBN} cDNA 주형을 생산한다.

도 4는 본 발명에서 합성된 전체-길이의 JEV cDNA 주형 단독으로는 감염성이 없으나, 시험관내 전사과정을 통해서 감염성이 있는 RNA의 제조를 위해서는 상기 cDNA가 반드시 필요하다는 사실을 보여주는 것으로써, 시험관내 전사과정에 사용된 전체-길이의 JEV cDNA 주형과 이로부터 전사된 합성 RNA를 나타내는 전기영동 사진(A) 및 사용된 전체-길이 JEV cDNA 주형과 전사된 합성 RNA를 함께 BHK-21 세포에 형질전환(transfection)시켰을 때 얻어진 감염성 정도를 나타내는 그래프(B)이다.

도 5는 감염성이 있는 JEV cDNA에서 합성된 JEV 바이러스(synthetic JEV)와 모 바이러스(parental virus) CNU/LP2를 비교한 것으로서, 합성된 JEV 및 모 바이러스 CNU/LP2의 플라크 분석 사진(A), 합성된 JEV 및 모 바이러스 CNU/LP2로 감염된 BHK-21 세포에서 생성되는 바이러스의 성장 동역학(growth kinetics)을 보여주는 그래프(B), 면역블롯(immunoblot)에 의한 바이러스 단백질의 발현정도(C), 및 노던 블롯(northern blot)에 의한 바이러스 RNA의 발현정도(D)를 보여주는 전기영동 사진이다.

도 6은 pBAC^{SP6}/JVFLx/gm/*Xba*I 유래의 재조합된 JEV(recombinant JEV)에 존재하는 *Xho*I 유전자 마커(genetic marker)의 존재를 보여주는 것으로써, pBAC^{SP6}/JVFLx/*Xba*I^{MBN} 및 *Xho*I 유전자 마커가 엔지니어링된 pBAC^{SP6}/JVFLx/gm/*Xba*I^{MBN}으로부터 합성된 RNA 전사체로 형질전환된 BHK-21 세포에서 JVFLx/*Xba*I^{MBN} JEV 바이러스 및 재조합된 JEV 바이러스 JVFLx/gm/*Xba*I^{MBN}를 생성한다. 생성된 바이러스를 BHK-21 세포에 계대배양하여 계대배양 1과 계대배양 3의 재조합된 JEV JVFLx/gm/*Xba*I^{MBN}를 얻었다. 얻어진 JEV 게놈 RNA를 화살표로 표시된 프라이머를 사용하여 RT-PCR을 수행한 결과, 얻어지는 JEV-특이적 앰플리콘의 크기(2,580 bp)와 이를 *Xho*I로 절단했을 때 얻어지는 절편의 크기(1,506 bp와 1,074 bp)를 나타낸 개략도(A), 및 상기 JVFLx/*Xba*I^{MBN} 및 재조합된 JEV JVFLx/gm/*Xba*I^{MBN} 게놈 RNA로부터 합성된 JEV-특이적 앰플리콘과 이를 *Xho*I로 절단했을 때 얻어지는 절편을 보여주는 전기영동 사진(B)이다.

도 7은 180 세대동안 유지되는 감염성이 있는 JEV cDNA 클론 pBAC^{SP6}/JVFLx/*Xba*I으로부터 전사된 합성 RNA의 감염성 정도를 보여주는 그래프이다.

도 8은 JEV cDNA를 벡터로 사용하여 이형 단백질을 발현하는 것을 보여주는 것으로서, SP6 RNA 중합효소를 이용한 런-오프 전사에 사용된 본 발명의 cDNA 주형에 대한 개략도(A), GFP 단백질의 발현을 보여주는 동초점 현미경 사진(B) 및 LUC 단백질의 유도를 보여주는 그래프(C)이다.

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

- <14> 본 발명은 일본뇌염 바이러스(Japanese encephalitis virus, 이하 'JEV'라 약칭함)의 신규한 게놈 RNA 및 상기 JEV 게놈 RNA에 대한 감염성이 있는 JEV cDNA에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 서열번호 15로 기재되는 전체-길이(full-length)의 JEV 게놈 RNA 및 상기 JEV 게놈 RNA에 대한 감염성이 있는 JEV cDNA에 관한 것이다.
- <15> JEV는 플라비비리대(flaviviridae) 패밀리에 속하는 RNA 바이러스의 일원으로써 모기에 의해서 전파된다. JEV는 인간, 특히 어린이에게 영구적인 신경정신질환(neuropsychiatric sequelae)을 야기시키고 심지어는 사망을 일으키는 중요한 병원성바이러스로 알려져 있다 (Tsai, *Vaccine*, 2000, 18(Suppl 2), 1-25; Solomon, *Neurological Infections and Epidemiology*, 1997, 2, 191-199; Umenai et al., *Bull. W.H.O.*, 1985, 63, 625-631). JEV 바이러스의 전파(transmission)는 최근 남반구(Southern Hemisphere)에서도 보고가 되었는데, 이것은 상기 JEV 바이러스가 전세계적으로 공중 보건을 위협할 수도 있음을 의미한다(Hanna, et al., *Med. J. Aust.*, 1999, 170, 533-536; Hanna, et al., *Med. J. Aust.*, 1996, 165, 256-260; Mackenzie et al., *Arch. Virol.*, 1994, 136, 447-467).
- <16> JEV는 단일가닥(single-stranded)의 작은-겹질(small-enveloped) 바이러스이며 약 11 kb 길이의 양성-센스(positive-sense) RNA 게놈을 가지고 있다. 게놈은 하나의 긴 전사해독틀(open reading frame, 이하 'ORF'라 약칭함)을 가지고 있으며, ORF의 양쪽 끝 부위에 바이러스

의 자가복제에 중요한 역할을 하는 시스-작용성(*cis*-acting) 인자들을 가진 5' 및 3' 비번역부위(nontranslated region, NTR)로 구성되어 있다. JEV의 RNA 게놈은 5'-말단에 타입 I 캡(cap) 구조를 가지고 있으나, 3'-말단에 폴리(A) 꼬리 구조는 가지고 있지 않다. ORF는 하나의 큰 다중단백질(polyprotein)로 번역되며, 이것은 동시(co)- 또는 후(post)-번역적으로 프로세스 되어서 세 개의 구조단백질과 일곱 개의 비구조 단백질이 생산된다. 상기 유전자들은 JEV RNA 게놈상에서 C-prM-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5와 같은 배열을 가진다 (Lindenbach and Rice, *Flaviviridae: The viruses and their replication*, 2001, 991-1041, Lippincott Williams&Wilkins Publishers; Venugopal and Gould, *Vaccine*, 1994, 12, 966-975; Chamber et al., *Ann. Rev. Microbiol.*, 1990, 44, 649-688). JEV 바이러스 유전자 산물의 기능, JEV의 자가복제, 신경침입성(neurovirulence), 및 병원성(pathogenesis)에 관여하는 분자생물학적인 메카니즘과 같은 내용들은 현재까지 잘 알려져 있지 않은데, 가장 큰 이유는 신뢰할 수 있는 역상 유전자 시스템(reverse genetics system)이 존재하지 않기 때문이다.

<17> 양성-센스 RNA 바이러스에 대한 연구는 역상 유전자 시스템의 개발과 더불어 급속도로 발전되어 왔으며, 역상 유전자 시스템에는 RNA-론치(RNA-launched) 접근방식과 DNA-론치(DNA-launched) 접근방식이 있다. 역상 유전자 시스템은 관심있는 바이러스 게놈 RNA에 대해서 감염성이 있는 cDNA 클론을 제조한 후, 상기 감염성이 있는 cDNA를 주형으로 하여 RNA 전사체를 만들고, 상기 감염성이 있는 RNA 전사체로부터 합성된 바이러스(synthetic virus)를 생산하는 시스템이다.

- <18> 전통적인 "RNA-론치(RNA-launched)" 접근방법에서는, 세포들이 감염성이 있는 cDNA 클론 으로부터 합성된 RNA 전사체로 형질전환(transfection)되며, 상기 세포들로부터 합성된 바이러스(synthetic virus)가 회수된다(Satyanarayana et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999, 96, 7433-7438; van Dinten et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, 94, 991-996; Liljestrom and Garoff, *Biotechnology*, 1991, 9, 1356-1361; Rice et al., *New Biol.*, 1989, 1, 285-296, Rice et al., *J. Virol.*, 1987, 61, 3809-3819).
- <19> 또한, "DNA-론치(DNA-launched)" 접근방법에서는 감염성이 있는 cDNA 클론을 수용 세포 (susceptible cell)에 직접 형질전환시킴으로써 합성된 바이러스를 제조한다. 상기 방법은 최초로 폴리오바이러스에 대하여 적용된 것으로(Racaniello and Baltimore, *Science*, 1981, 214, 916-919), 알파바이러스(alphavirus)에 대하여도 적용이 되었다(Schlesinger and Dubensky, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 1999, 10, 434-439).
- <20> 상기 두 가지 접근방법은 가장 큰 RNA 게놈을 가지고 있는 코로나바이러스 (coronavirus)(Almazan et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000, 97, 5516-5521)를 포함하여 많은 양성-센스 RNA 바이러스 패밀리에 대하여 감염성이 있는 cDNA 클론을 제조하기 위하여 사용되어 왔다. 상기 감염성이 있는 cDNA 클론들은 양성-센스 RNA 바이러스에 대한 많은 의문점들을 해결하는데 중요하게 사용되어 왔다.
- <21> 그러나, 일본뇌염 바이러스에 대해서는 아직까지 역상 유전자 시스템이 구축되지 못하였고, 이에 따라 JEV에 대한 연구는 진척되지 못하고 있다. 이는 전체-길이(full-length)의 감염성이 있는 cDNA 클론의 구축이 성공하지 못하였기 때문인데, 가장 큰 이유는 클론된 cDNA의 유전학적인 불안정성에 기인한다. 결국 많은 연구 노력에도 불구하고 현재까지 JEV에 대한 유전학적으로 안정한 전체-길이의 감염성이 있는 cDNA 분자클론(molecular clone)은 합성이 되지

못한 실정이다(Mishin et al., *Virus Res.*, 2001, 81, 113-123; Zhang et al., , 2001, 96, 171-182; Sumiyoshi et al., *J. Infect. Dis.*, 1995, 171, 1144-1151; Sumiyoshi et al., *J. Virol.*, 1992, 66, 5425-5431).

<22> 이에, 본 발명자들은 한국에 존재하는 야생 모기로부터 분리한 한국형(Korean isolate) JEV를 사용하여 바이러스 게놈 RNA의 완전한(authentic) 전체-길이 뉴클레오타이드 염기서열을 정확하게 밝히고, 상기 JEV 게놈 RNA에 대한 전체-길이의 감염성이 있는 cDNA를 합성함으로써 역상 유전자 시스템을 개발하였다. 이렇게 개발된 상기 감염성이 있는 JEV cDNA를 이용한 역상 유전자 시스템은 JEV 유전자 산물에 대한 기능, JEV의 자가복제, 신경침입성, 및 병원성에 관여하는 분자생물학적인 메커니즘을 밝히는데 유용하게 사용될 수 있으며, 또한 상기 감염성이 있는 JEV cDNA를 이형 유전자의 발현을 위한 벡터로 유용하게 사용할 수 있음을 밝힘으로써 본 발명을 완성하였다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<23> 본 발명의 목적은 일본뇌염 바이러스의 신규한 게놈 RNA, 상기 게놈 RNA에 대한 감염성이 있는 cDNA, 및 상기 cDNA를 이용하여 제조되는 새로운 유전자 발현 벡터를 제공하는 것이다.

【발명의 구성 및 작용】

<24> 상기 목적을 달성하기 위하여,

- <25> 1) 본 발명은 JEV 바이러스의 신규한 게놈 RNA를 제공한다.
- <26> 2) 본 발명은 자가복제를 할 수 있는 JEV RNA 전사체를 생산할 수 있는 감염성이 있는 JEV cDNA를 제공한다.
- <27> 3) 본 발명은 상기 전체-길이 JEV 게놈 RNA에 대한 cDNA를 포함하는 벡터를 제공한다.
- <28> 4) 본 발명은 상기 JEV cDNA 벡터로부터 합성된 자가복제할 수 있는 RNA 전사체를 제공한다.
- <29> 5) 본 발명은 상기 JEV cDNA 벡터로부터 합성된 RNA 전사체로 형질전환된 세포로부터 얻어진 재조합된 JEV 바이러스(recombinant JEV virus)를 제공한다.
- <30> 6) 본 발명은 상기 JEV cDNA를 포함하는 JEV 발현 벡터를 제공한다.
- <31> 7) 본 발명은 상기 JEV 발현벡터를 이용하여 이형 유전자(heterologous gene)를 발현시키는 방법을 제공한다.
- <32> 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- <33> I. 본 발명은 JEV 바이러스의 신규한 게놈 RNA를 제공한다.
- <34> 본 발명의 한국형 JEV 게놈 RNA는 5'-비번역 부위, 폴리펩타이드 코딩 부위, 및 3'-비번역 부위로 구성된다.
- <35> 상기에서, 게놈 RNA의 전체 길이는 10,968 bp이며, 95 bp로 이루어진 5'-비번역 부위, 10,299 bp로 이루어진 폴리펩타이드 코딩 부위, 및 574 bp로 이루어진 3'-비번역 부위로 구성되어있다.

- <36> 본 발명의 바람직한 실시예에 따르면, 본 발명의 JEV 바이러스의 신규한 게놈 RNA는 서열번호 15로 기재되는 서열이다. 또한, 상기 서열번호 15로 기재되는 JEV 바이러스의 게놈 RNA와 98% 이상의 상동성이 있는 서열도 본 발명의 신규한 게놈 RNA에 포함된다.
- <37> 본 발명의 한국형 JEV 바이러스는 한국형 일본뇌염 바이러스인 JEV K87P39 바이러스로부터 플라크분리정제(plaque-purification) 기술을 이용하여 다시 분리 정제된 바이러스로서 "JEV CNU/LP2"라 명명하였다(도 1 참조).
- <38> 본 발명자들은 한국형 일본뇌염 바이러스인 JEV CNU/LP2 바이러스의 전체-길이 뉴클레오타이드 염기서열을 밝히기 위해서 긴 RT-PCR(long RT-PCR) 방법으로 바이러스의 5'-말단과 3'-말단을 제외한 나머지 부위를 세 개의 중첩되는 cDNA, JVF(nt 1-3865), JVM(nt 3266-8170), 및 JVR(nt 7565-10893) cDNA로 합성 및 증폭하여 각각 약 3.9 kbp(JVF), 약 4.9 kbp(JVM), 및 약 3.3 kbp(JVR)의 절편을 얻고 이에 대한 염기서열을 밝혔다(도 2의 A 참조).
- <39> 바이러스 게놈 RNA의 3'-말단의 정확한 염기서열을 밝히기 위해서는 먼저 올리고뉴클레오타이드 T를 CNU/LP2 게놈 RNA의 3'-말단에 접합(ligation)시켜야 하며(도 2의 B 참조), 이때 올리고뉴클레오타이드 T는 cDNA 합성과 증폭시 필요한 특이한 프라이머 바인딩 자리를 제공한다(도 2의 B 참조). 염기서열을 분석한 결과, JEV 바이러스의 전체 염기서열이 밝혀진 대부분의 분리주의 경우에서 보고된 바와 같이, 본 발명자들은 큰 삽입체(약 700 bp)를 가진 모든 클론들의 바이러스 게놈 RNA의 3'-말단이 -GATCT¹⁰⁹⁶⁸ 로 끝난다는 것을 발견하였다. 반면에, 작은 삽입체(약 450 bp)를 가진 모든 클론들은 바이러스 RNA 게놈의 염기서열 10,684번째에서

종결되어 큰 밴드보다 284 bp가 작아진 것을 알 수 있었다. 작은 삽입체의 경우 바이러스 게놈 RNA의 3'-말단에 284 뉴클레오타이드를 포함하고 있지 않기 때문에, 전체-길이의 JEV cDNA 결합(assembly) 과정 동안 본 발명자들은 큰 삽입체의 뉴클레오타이드 염기서열을 사용하였다.

<40> 바이러스 게놈 RNA의 5'-말단의 정확한 염기서열을 밝히기 위해서는 먼저 5'-말단에 존재하는 캡 구조를 제거하였으며, 캡 구조가 제거된 바이러스 게놈 RNA는 자가-접합(self-ligation)시킨 후 접합된 3'-5' 부위는 바이러스 3'-말단 근처의 염기서열(nt 10259-nt 10276)에 상보적으로 결합하는 양성-센스 프라이머와 바이러스 5'-말단 근처의 염기서열(nt 164-nt 181)에 상보적으로 결합하는 음성-센스 프라이머를 사용하여 첫 번째 사슬(first-strand) cDNA를 합성하고 PCR 증폭하였다(도 2의 D 참조). 아가로스 젤을 이용한 전기영동 결과, PCR로 증폭된 산물은 약 850 bp 크기의 단일 밴드로 나타났다(도 2의 E 참조). 이렇게 증폭된 앰플리콘들을 클로닝한 후, 무작위로 선별된 12개의 클론들의 염기서열을 분석한 결과, 12개의 모든 클론에서 바이러스 3'-말단 염기서열의 -GATCT¹⁰⁹⁶⁸ 다음에 5'-말단의 염기서열 ¹AGAAGT-가 연결되어 있는 것을 알 수 있었다(도 2의 B 및 도 2의 C 참조).

<41> 상기 결과로부터, 본 발명자들은

서열번호 15로 기재되는 JEV CNU/LP2 분리주(isolate)의 완전한 전체-길이의 뉴클레오타이드 염기서열을 밝혔다. JEV CNU/LP2 게놈 RNA의 전체 길이는 10,968 bp 이며, 이것은 95 bp로 이루어진 5'-비번역 부위, 10,299 bp로 이루어진 폴리펩타이드 코딩 부위, 및 574 bp로 이루어진 3'-비번역 부위의 세 부위로 구성되어있다. 상기 염기서열을 진뱅크(GenBank) 데이터베이스에서 염기서열이 모두 밝혀져 있는 공지된 26개의 JEV 바이러스 게놈 RNA(Ishikawa, K94P05, FU, CH2195LA, CH2195SA, RP-2ms, RP-9, CH1392, T1P1, YL, JaGAr01, HVI, TC, TL, Beijing-1, Ling, Vellore P20778, p3, SA14-14-2, SA(A), SA14-12-1-7, SA14-2-8, SA14, SA(V), GP78, 및 JaOArS982 바이러스주)의 전체-길이의 뉴클레오타이드 염기서열과 비교하였다. 비교분석에 사용된 바이러스주에 대한 분리지역, 분리연도, 출처, 및 진뱅크 접근번호(GenBank accession number)에 관한 정보를 하기에 요약하였다(표 1 참조).

【표 1】

위치	연도	균주	출처(source)	진뱅크 기탁번호
오스트레일리아	1995	FU	인간 혈청	AF217620
중국	1954	SA14	모기	U14163
		SA14-14-2	SA14 유도체	AF315119
		SA14-12-1-7	SA14 유도체	AF416457
		SA14-2-8	SA14 유도체	U15763
		SA(V)	SA14 유도체	D90194
		SA(A)	SA14-14-2 유도체	D90195
	1949	Beijing-1	인간의 뇌	L48961
인도	1949	P3	모기	U47032
	1978	GP78	인간의 뇌	AF075723
	1958	Vellore P20778	인간의 뇌	AF080251
일본	1982	JaO ArS982	모기	M18370
	IU	Ishikawa	IU	AB051292
	1959	JaG Ar01	모기	AF069076
한국	1994	K94P05	모기	AF045551
	1987	K87P39	모기	본 발명
대만	1997	T1P1	모기	AF254453
	1994	CH2195LA	CH2195 유도체	AF221499
	1994	CH2195SA	CH2195 유도체	AF221500
	1990	CH1392	모기	AF254452
	1985	RP-2ms	모기	AF014160
	1985	RP-9	모기	AF014161
	1965	Ling	인간의 뇌	L78128
	IU	YL	IU	AF486638
	IU	TC	모기	AF098736
	IU	TL	모기	AF098737
	IU	HVI	모기	AF098735

<43> IU : 정보가 없음

<44> JEV 전체-길이의 뉴클레오타이드 염기서열을 비교한 결과, CNU/LP2 JEV 바이러스는 각각 89.0%(Ishikawa), 89.1%(K94P05), 89.3%(FU), 95.8%(CH2195LA), 95.9%(CH2195SA), 97.1%(RP-2ms), 97.2%(RP-9), 97.3%(CH1392), 97.3%(T1P1), 97.0%(YL), 97.4%(JaGAr01), 97.1%(HVI), 96.9%(TC), 96.7%(TL), 96.4%(Beijing-1), 96.3%(Ling), 96.0%(Vellore P20778), 97.1%(p3), 97.4%(SA14-14-2), 97.5%(SA(A)), 97.5%(SA14-12-1-7), 97.7%(SA14-2-8),

97.9%(SA14), 97.9%(SA(V)), 96.3%(GP78), 및 97.1%(JaOArS982)의 상동성을 가진다(표 2 참조). 따라서, 본 발명의 서열번호 15로 기재되는 염기서열과 98% 이상의 상동성을 가지는 JEV 바이러스의 게놈 RNA의 염기서열은 본 발명의 권리범위에 속한다.

<45> 【표 2】

분리주	% 서열 상동성 ^a																													
	Ishikawa	K94P05	FU	CH2195LA	CH2195SA	RP-2ms	RP-9	CH1392	T1P1	YL	JaOAr01	HV	TC	TL	Beijing-1	Ling	Yellare P20778	p3	SA14-14-2	SA(A)	SA14-12-1-7	SA14-2-8	SA14	SA(V)	K87P39	GP78	JaOArS982	WNV		
Ishikawa	97.0	90.1	88.3	88.3	88.9	89.0	89.1	89.1	88.9	89.2	89.0	89.9	88.8	88.9	88.8	88.8	88.8	89.1	88.8	88.9	88.9	89.1	89.2	89.2	89.0	88.8	88.9	88.9	89.0	
K94P05	97.7	88.8	88.6	88.6	89.2	89.3	89.4	89.4	89.1	89.5	89.2	89.1	89.0	89.0	89.0	88.9	89.4	89.1	89.2	89.2	89.3	89.5	89.5	89.1	89.0	89.5	88.7			
FU	97.7	97.0	88.9	88.9	89.3	89.4	89.4	89.4	89.2	89.6	89.4	89.2	89.1	89.3	89.0	89.1	89.4	89.1	89.2	89.2	89.3	89.6	89.6	89.3	88.7	89.4	89.5			
CH2195LA	97.7	97.0	89.9	89.9	96.2	96.3	96.3	96.3	96.1	96.5	96.2	95.9	95.8	95.6	95.7	95.1	96.3	96.6	96.7	96.7	96.8	97.1	97.1	95.8	95.7	97.3	89.4			
CH2195SA	97.1	96.5	99.0	99.0	96.3	96.3	96.3	96.1	96.5	96.2	95.9	95.8	95.6	95.7	95.1	96.3	96.6	96.7	96.7	96.9	97.1	97.1	95.9	95.7	97.3	89.5				
RP-2ms	97.5	96.8	99.4	99.4	98.8	99.9	99.5	99.5	99.3	99.4	98.8	98.2	98.1	97.2	97.1	96.6	97.9	98.0	98.1	98.1	98.3	98.5	98.5	97.1	96.9	97.7	89.4			
RP-9	97.6	96.9	99.5	99.5	98.9	99.7	99.6	99.5	99.3	99.5	98.8	98.2	98.2	97.2	97.2	96.7	98.0	98.1	98.1	98.1	98.3	98.5	98.5	97.2	96.9	97.8	89.4			
CH1392	97.8	97.2	99.7	99.7	99.1	99.6	99.7	99.9	99.5	99.7	99.0	99.3	99.3	97.3	97.3	96.8	98.2	98.2	98.3	98.3	98.4	98.6	98.7	97.3	97.0	97.9	89.4			
T1P1	97.5	96.8	99.3	99.3	98.7	99.1	99.2	99.4	99.5	99.7	99.0	98.3	98.3	97.3	97.3	96.8	98.1	98.2	98.2	98.3	98.4	98.6	98.6	97.3	97.0	97.8	89.4			
YL	97.4	96.7	99.2	99.2	98.7	99.1	99.2	99.4	99.0	99.4	98.8	98.1	98.0	97.1	97.1	96.5	97.9	98.0	98.0	98.0	98.2	98.4	98.4	97.0	96.8	97.6	89.2			
JaOAr01	97.1	96.4	98.9	98.9	98.2	98.7	98.8	99.1	98.8	98.7	99.1	98.4	98.4	97.4	97.4	96.9	98.3	98.3	98.4	98.4	98.5	98.8	98.8	97.4	97.1	98.0	89.5			
HV	97.2	96.5	98.9	98.9	98.3	98.8	98.9	99.1	98.7	98.8	98.7	98.6	98.4	97.2	97.2	96.7	98.1	98.1	98.1	98.1	98.3	98.5	98.5	97.1	96.9	97.7	89.4			
TC	97.0	96.4	98.8	98.8	98.2	98.7	98.8	99.0	98.6	98.5	98.2	98.4	99.0	97.2	97.1	96.4	97.7	97.8	97.9	97.9	98.1	98.3	98.3	96.9	96.7	97.4	89.5			
TL	97.2	96.6	98.0	98.0	98.4	98.9	98.9	99.2	98.8	98.7	98.4	98.5	99.7	97.0	96.8	96.1	97.5	97.8	97.7	97.7	97.9	98.1	98.1	96.7	96.5	97.2	89.3			
Beijing-1	97.3	96.6	99.0	99.0	98.5	98.9	99.0	99.2	98.8	98.7	98.4	98.6	99.2	99.3	99.1	96.7	97.4	97.2	97.2	97.3	97.5	97.6	97.6	96.4	96.1	97.0	89.5			
Ling	97.4	96.7	99.1	99.1	98.6	99.0	99.1	99.3	98.9	98.9	98.6	98.7	99.0	99.2	99.2	96.7	97.3	97.1	97.2	97.2	97.4	97.6	97.6	96.3	96.2	97.2	89.5			
Yellare P20778	97.7	97.1	99.5	99.5	98.9	99.4	99.5	99.7	99.3	99.2	98.9	99.1	99.1	99.2	99.3	99.4	98.8	98.6	96.7	96.7	96.9	97.1	97.1	96.0	95.6	96.4	89.5			
p3	97.8	97.1	99.5	99.5	98.9	99.4	99.5	99.7	99.4	99.3	99.0	99.2	99.0	99.2	99.2	99.5	99.8	98.2	98.3	98.3	98.5	98.7	98.7	97.1	97.1	97.8	89.5			
SA14-14-2	97.9	97.1	99.5	99.5	98.9	99.3	99.4	99.7	99.2	99.2	98.9	99.0	99.0	99.1	99.2	99.6	99.6	99.8	99.6	99.4	99.4	99.4	97.4	97.3	98.1	89.4				
SA(A)	97.1	96.6	98.8	98.8	98.2	98.7	98.8	99.0	98.6	98.5	98.2	98.3	98.1	98.3	98.4	98.5	98.9	98.9	98.9	99.6	99.4	99.4	99.4	97.5	97.4	98.2	89.4			
SA14-12-1-7	97.2	96.6	98.9	98.9	98.3	98.7	98.9	99.1	98.7	98.6	98.3	98.4	98.2	98.4	98.5	98.6	99.0	99.0	98.9	99.7	99.4	99.5	99.5	97.5	97.4	98.2	89.4			
SA14-2-8	97.7	97.3	99.4	99.4	98.8	99.3	99.4	99.6	99.2	99.2	98.8	98.9	98.8	98.9	99.0	99.2	99.5	99.6	99.5	99.1	99.2	99.6	99.6	97.7	97.6	98.3	89.5			
SA14	97.5	96.7	99.0	99.0	98.4	98.9	99.0	99.2	98.8	98.8	98.6	98.7	98.4	98.5	98.6	98.7	99.1	99.2	99.2	98.5	98.5	99.2	99.9	97.9	97.8	98.6	89.6			
SA(V)	97.3	96.6	98.9	98.9	98.3	98.7	98.8	99.1	98.7	98.6	98.4	98.5	98.2	98.4	98.5	98.6	98.9	99.0	99.0	99.3	98.4	99.0	99.5	97.9	97.8	98.6	89.8			
K87P39	97.4	96.7	98.9	98.9	98.2	98.7	98.8	99.1	98.6	98.6	98.2	98.4	98.2	98.4	98.5	98.6	98.9	99.0	99.0	98.4	98.4	99.0	98.6	98.5	96.3	97.1	89.5			
GP78	97.0	96.4	98.6	98.6	98.0	98.5	98.6	98.8	98.5	98.4	98.0	98.1	98.0	98.2	98.3	98.3	98.7	98.7	98.7	98.1	98.2	98.7	98.2	98.2	98.2	97.2	89.6			
JaOArS982	97.6	96.8	97.8	97.8	97.2	97.7	97.8	98.0	97.8	97.8	97.2	97.3	97.1	97.3	97.4	97.5	97.9	97.9	98.0	97.3	97.4	97.9	97.8	97.4	97.5	97.1	89.6			
WNV	76.2	75.8	76.8	76.8	76.1	76.4	76.5	76.7	76.5	76.5	76.3	76.4	76.1	76.2	76.3	76.4	76.6	76.6	76.8	76.2	76.3	76.7	76.6	76.5	76.4	76.5	76.7			

^a 완전한 게놈의 % 뉴클레오타이드 서열 상동성은 오른쪽 위에 나타내었다. 완전한 게놈의 % 아미노산 상동성은 왼쪽 아래에 나타내었다. K87P39와의 % 서열 상동성은 굵은 글씨로 나타내었다.

<46> 본 발명의 염기서열은 JEV 폴리펩타이드 코딩 부위 이외에도 바이러스의 자가복제, 전사, 및 번역을 조절하는 시스-작용성(

cis-acting) 인자들을 가지고 있는 5'-비번역 부위와 3'-비번역 부위의 정확한 염기서열을 분자생물학적 실험방법으로 밝혔다. 이는 몇몇 연구에서 5'-말단 및 3'-말단 부위 모두가 시험관내(You and Padmanabhan, *J. Biol. Chem.*, 1999, 274, 33714-33722) 및 생체내(Khromykh et al., *J. Virol.*, 2001, 75, 6719-6728) 플라비바이러스 RNA 복제의 개시에 요구된다는 것이 알려져 있기 때문에 매우 중요한 의미를 가진다. 특히, 본 발명에서 JEV CNU/LP2의 5'-말단 및 3'-말단의 염기서열로 밝혀진 ¹AGAAGT- 및 -GATCT¹⁰⁹⁶⁸ 은 바이러스의 자가복제에 중요한 역할을 할 것으로 생각된다.

<47> 본 발명은 상기에서 밝혀진 JEV의 완전한 전체-길이 염기서열을 가진 합성 RNA 전사체(synthetic RNA transcript)가 세포에 형질전환되었을 때, 감염성이 있는 합성된 JEV(synthetic JEV) 바이러스가 생산됨을 하기에서 실험적으로 증명함으로써, JEV가 자가복제 시 필요한 완전한(complete) 전체-길이의 염기서열을 기능적인 측면에서 세계 최초로 입증하였다.

<48> II. 본 발명은 자가복제를 할 수 있는 JEV RNA 전사체를 생산할 수 있는 감염성이 있는 JEV cDNA를 제공한다.

<49> 본 발명의 감염성이 있는 JEV cDNA는 서열번호 15로 기재되는 염기서열 또는 서열번호 15와 98% 이상의 상동성이 있는 전체-길이의 JEV 게놈 RNA의 염기서열을 토대로 합성되며, 시험관내 전사(*in vitro* transcription)를 통해서 자가복제를 할 수 있는 JEV RNA 전사체를 합성하는 데 주형(template)으로 사용된다. 본 발명

의 전체-길이의 JEV cDNA는 먼저 5'-말단 및 3'-말단을 포함하는 바이러스 게놈 RNA를 RT-PCR에 의하여 여러 개의 중첩하는 cDNA로 증폭시킨 후 이들을 연결함으로써 제조된다.

<50> 시험관내 런-오프(run-off) 전사 반응을 통해 전체-길이의 합성 JEV RNA 전사체를 생산하기 위해서 JEV 게놈 RNA의 5'-말단 바로 앞에 SP6 또는 T7 프로모터 염기서열부위를 포함하고, JEV 게놈 RNA의 3'-말단 바로 뒤에 런-오프 자리를 인위적으로 만들 수 있도록 바이러스 게놈 RNA에 존재하지 않는 유일한 제한효소 인식 염기서열을 포함한다(도 3의 A 참조). 본 발명에서는 바람직한 실시예로써 JEV 게놈 RNA에 해당하는 세 개의 중첩하는 cDNA(JVF, JVM 및 JVR), SP6 또는 T7 프로모터 염기서열을 포함한 5'-말단부위, 및 런-오프 자리로써 *XhoI*과 *XbaI* 인식염기서열을 포함한 3'-말단부위에 해당하는 두 개의 cDNA를 이용하여 3개의 SP6-유도된(driven) 전체-길이 JEV cDNA 와 3개의 T7-유도된(driven) 전체-길이 JEV cDNA를 각각 제조하였다(도 3의 B와 도 3의 C 참조). 그러나, 상기 두 가지 프로모터 이외에도 다른 프로모터를 사용할 수 있음은 당업계에 종사하는 사람에게 있어서 자명하다. 또한, 본 발명에서 개발된 전체-길이 JEV cDNA는 런-오프 자리로써 *XhoI*과 *XbaI*를 사용하였지만, 이외에도 다른 제한효소를 사용할 수 있음은 당업계에 종사하는 사람에게 있어서 자명하다.

<51> 본 발명의 JEV cDNA는 BAC(bacterial artificial chromosome)인 pBeloBAC11 플라스미드를 벡터로 사용하여 상기와 같이 여러 개의 중첩하는 cDNA를 포함하는 서브클론(subclone)을 제조한 후 이들을 서로 연결함으로써 JEV cDNA를 제공한다.

- <52> 본 발명자들은 바람직한 실시예에서 SP6 프로모터를 가지며 서열번호 43, 서열번호 44, 및 서열번호 45로 기재되는 JEV cDNA와 T7 프로모터를 가지며 각각 서열번호 46, 서열번호 47, 및 서열번호 48로 기재되는 JEV cDNA를 제공한다(도 3의 B 및 도 3의 C 참조).
- <53> III. 본 발명은 상기 전체-길이 JEV 게놈 RNA에 대한 cDNA를 포함하는 벡터를 제공한다.
- <54> 본 발명의 벡터는 상기 JEV 전체-길이의 감염성이 있는 cDNA를 포함하는 것을 특징으로 한다. 본 발명의 바람직한 실시예에서는 SP6 프로모터를 가지며 서열번호 43, 서열번호 44, 및 서열번호 45로 기재되는 JEV cDNA를 포함하는 pBAC^{SP6}/JVFL/*Xho*I, pBAC^{SP6}/JVFLx/*Xho*I, pBAC^{SP6}/JVFLx/*Xba*I 및 T7 프로모터를 가지며 서열번호 46, 서열번호 47, 및 서열번호 48로 기재되는 pBAC^{T7}/JVFL/*Xho*I, pBAC^{T7}/JVFLx/*Xho*I, pBAC^{T7}/JVFLx/*Xba*I 벡터를 제공한다. 본 발명자들은 상기 벡터 중에서 가장 효율이 좋은 pBAC^{T7}/JVFLx/*Xba*I 및 pBAC^{SP6}/JVFLx/*Xba*I을 2002년 10월 2일부로 한국생명공학연구원 유전자은행에 기탁하였다(수탁번호 : KCTC 10346BP, KCTC 10347BP).
- <55> IV. 본 발명은 상기 JEV cDNA 벡터로부터 합성된 자가복제할 수 있는 RNA 전사체를 제공한다.
- <56> 시험관내 런-오프 전사반응의 경우, 주형(template)으로 사용되는 JEV cDNA는 상기에서 기술한 것과 같이 바이러스의 3'-말단 바로 뒤에 런-오프 자리로써 엔지니어링한 *Xho*I 또는 *Xba*I 제한효소의 절단(digestion)에 의하여 선형화된다(도 3 참조). *Xho*I의 처리에 의하여 선형화된 두 가지 플라스미드(pBAC^{SP6}/JVFL/*Xho*I와 pBAC^{SP6}/JVFLx/*Xho*I)는 m⁷G(5')ppp(5')A 캡 구

조 유사체의 존재하에서 SP6 폴리머라제 런-오프 전사반응을 통해서, 5'-말단에 캡 구조를 가지는 동시에 3'-말단에 바이러스와 연관되지 않은 세 개의 뉴클레오타이드 CGA를 가진 합성 RNA 전사체를 생산하는 데 주형으로 사용된다(도 3의 B 참조). 이와 유사하게, *XbaI*-선형화된 pBAC^{SP6}/JVFLx/*XbaI* 플라스미드는 m⁷G(5')ppp(5')A 캡 구조 유사체의 존재하에서 SP6 폴리머라제 런-오프 전사반응을 통해서, 5'-말단에 캡 구조를 가지는 동시에 3'-말단에 바이러스와 연관되지 않은 네 개의 뉴클레오타이드 CTAG를 가진 합성 RNA 전사체를 생산하는 데 주형으로 사용된다(도 3의 B 참조).

<57> 합성된 JEV RNA 전사체의 특이적 감염성(specific infectivity)을 정량하기 위하여, 감염 센터 분석(infectious center assay)을 실시하였다. 그 결과, 합성된 RNA 전사체는 수용성(susceptible) BHK-21 세포내로 형질전환시켰을 때, 모두 높은 감염성($3.4-4.3 \times 10^5$ PFU/ μ g)을 나타내었다(표 3 참조). 이와 마찬가지로, T7 프로모터를 가지는 세 개의 전체-길이 JEV cDNA pBACT⁷/JVFL/*XhoI*, pBACT⁷/JVFLx/*XhoI*, 및 pBACT⁷/JVFLx/*XbaI*을 주형으로 사용하여 m⁷G(5')ppp(5')A 캡 구조 유사체의 존재하에서 T7 폴리머라제 런-오프 전사반응을 통해서 합성한 RNA 전사체도 높은 특이적 감염성($2.9-3.8 \times 10^5$ PFU/ μ g)을 나타내었다(표 3 참조).

<58> 어떤 플라비바이러스의 경우, 감염이 있는 cDNA로부터 전사된 합성 RNA의 3'-말단에 바이러스와 연관되지 않은 뉴클레오타이드 염기서열이 존재하면 합성된 RNA의 특이적 감염성이 감소되거나 또는 없어진다(abrogate)는 것이 보고되었다(Yamshchikov et al.,

Virology, 2001, 281, 294-304). 상기 보고에 근거하여, JEV cDNA로부터 JEV의 3'-말단에 바이러스와 연관되지 않은 뉴클레오타이드 염기서열이 존재하지 않는 합성된 RNA 전사체의 특이적 감염성을 분석하기 위하여 *Xba*I 처리에 의하여 선형화되고 MBN(mung bean nuclease)으로 처리된 pBAC^{SP6}/JVFLx/*Xba*I^{MBN}(도 3의 B 참조) 및 pBAC^{T7}/JVFLx/*Xba*I^{MBN}(도 3의 C 참조)와 MBN으로 처리하지 않은 pBAC^{SP6}/JVFLx/*Xba*I 및 pBAC^{T7}/JVFLx/*Xba*I으로부터 합성된 RNA 전사체를 BHK-21 세포에 형질전환시켜 합성된 RNA 전사체의 특이적 감염성을 비교하였다. 그 결과, MBN으로 처리된 pBAC^{SP6}/JVFLx/*Xba*I^{MBN} cDNA 주형으로부터 전사된 RNA의 특이적 감염성은 3.1×10^6 PFU/ μ g으로 측정되었는데, 이것은 MBN으로 처리되지 않은 pBAC^{SP6}/JVFLx/*Xba*I cDNA 주형으로부터 전사된 RNA의 특이적 감염성인 3.4×10^5 PFU/ μ g보다 약 10배나 높은 것이다(표 3 참조, infectivity). 또한, pBAC^{T7}/JVFLx/*Xba*I^{MBN} cDNA로부터 합성된 RNA도 MBN 처리 이후에 증가된 감염성을 보였다(2.7×10^6 PFU/ μ g)(표 3 참조, infectivity). 따라서, 본 발명자들은 높은 감염성을 가진 합성된 JEV RNA 전사체를 생산하기 위해서는 JEV 게놈 RNA에 완전한(authentic) 3'-말단이 존재해야함을 확인하였다. 그러므로, 이렇게 개발된 감염성이 있는 JEV cDNA는 10^5 - 10^6 PFU/ μ g의 높은 특이적 감염성을 가지는 합성된 RNA 전사체를 생산하는 턴-오프 전사반응을 위한 주형으로 사용될 수 있다.

<59> 이러한 감염성이 있는 JEV cDNA를 조합하기 위한 이전 시도들의 경우(Mishin et al., *Virus Res.*, 2001, 81, 113-123; Zhang et al., *J. Virol. Methods*, 2001, 96, 171-182; Sumiyoshi et al., *J. Infect. Dis.*, 1995, 171, 1144-1151; Sumiyoshi et al., *J. Virol.*, 1992, 66, 5425-5431), 클로닝된 JEV cDNA의 불안정성으로 인하여 모두 실패하였다.

- <60> 이러한 문제를 극복하기 위하여, 두 개의 중첩하는 JEV cDNA를 시험관내 런-오프 전사반응의 주형으로 사용하기 전에 접합시킴으로써 하나의 주형이 제조되도록 디자인된 시스템을 이용한 연구가 시도되었다(Sumiyoshi et al., *J. Virol.*, 1992, 66, 5425-5431). 이렇게 접합된 JEV cDNA 주형으로부터 합성된 RNA 전사체의 특이적 감염성은 약 100 PFU/ μ g이었다. 이것은 너무 낮은 감염성이므로 바이러스의 분자생물학적 및 유전학적 분석을 위하여 상기 시스템을 유용하게 사용할 수 없다(Sumiyoshi et al., *J. Virol.*, 1992, 66, 5425-5431).
- <61> 본 발명에서는 *E. coli*에서 하나 내지 두 카피씩 유지되는 BAC 플라스미드에 JEV cDNA를 클로닝함으로써 유전자의 불안정성을 극복할 수 있었으며, 이렇게 합성된 감염성이 있는 JEV cDNA 플라스미드는 *E. coli*에서 증식되는 180 세대동안은 유전학적으로 안정하게 유지되었다(도 7 참조). 따라서, 본 발명자들은 BAC (bacterial artificial chromosome)을 도입함으로써 JEV 전체-길이의 감염성이 있는 cDNA의 합성시 발생하는 JEV cDNA의 유전학적 불안정성을 극복할 수 있었으며, 또한 합성된 감염성이 있는 JEV cDNA를 안정하게 다룰 수 있게 되었다.
- <62> 전체-길이의 감염성이 있는 JEV cDNA를 주형으로 사용하여 시험관내 전사반응을 통해서 완전한(authentic) 5'-말단 및 3'-말단을 가지는 JEV 합성 RNA 전사체를 합성할 수 있다는 것은 매우 중요한 의미를 가지는데, 그 이유는 몇몇 연구에서 5'-말단 및 3'-말단 부위 모두가 시험관내(You and Padmanabhan, *J. Biol. Chem.*, 1999, 274, 33714-33722) 및 생체내(Khromykh et al., *J. Virol.*, 2001, 75, 6719-6728) 플라비바이러스 RNA 복제의 개시에 요구된다는 것이 알려져 있기 때문이다. 본 발명자들은 감염성이 있는 JEV cDNA를 합성하기 위해서 다른 플라비바이러스의 감염성이 있는 cDNA를 합성할 때 사용된 방법을 응용하였다(van der Werf et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1986, 83, 2330-2334; Rice et al., *New Biol.*, 1989, 1,

285-296). JEV 게놈 RNA에 존재하는 캡 구조는 다이뉴클레오타이드인 AG와 연결되며, 이것은 플라비바이러스에서 매우 보존된 특성이다(Rice, *Flaviviridae: The viruses and their replication*, 1996, 931-960, Lippincott-Raven Publisher). 5'-말단의 완전함(authenticity)은 SP6 또는 T7 프로모터 전사 출발에 필요한 뉴클레오타이드 염기서열을 바이러스 게놈의 시작부위에 위치시킴으로써 확보되었다. SP6 또는 T7 폴리머라제에 의한 전사 반응에 있어서 $m^7G(5')ppp(5')A$ 캡 구조 유사체를 도입함으로써(Contreras et al., *Nucleic Acids Res.*, 1982, 10, 6353-6362), 본 발명자들은 수용성 세포에 대하여 높은 감염성을 가지며 완전한 5'-말단 및 캡 구조를 가지는 RNA 전사체를 합성하였다. 아울러, SP6 또는 T7 폴리머라제-유도 전사 반응에서 $m^7G(5')ppp(5')G$ 캡 구조 유사체를 도입하는 것은(Contreras et al., , 1982, 10, 6353-6362) 다이뉴클레오타이드 AG 상부에 바이러스와 연관되지 않은 추가적인 G 뉴클레오타이드를 위치시킨다. 종래에 보고된 바와 같이(Rice et al., *New Biol.*, 1989, 1, 285-296), 본 발명자들도 시험관내 전사반응시 추가된 G 뉴클레오타이드가 세포내 형질전환으로 생산된 합성 JEV 자손(synthetic JEV progeny)의 게놈 RNA에서 발견되지 않음을 알 수 있었다. 아울러, 추가적인 G 뉴클레오타이드를 첨가한 경우에도 본 발명자들은 감염성이 있는 cDNA 주형으로부터 합성된 RNA 전사체의 특이적 감염성 또는 자가복제 능력이 변화되지 않는다는 것을 관찰하였다.

<63> JEV RNA의 3'-말단에 위치하는 다이뉴클레오타이드 CT는 플라비바이러스에서 절대적으로 보존되어 있다(Rice,

Flaviviridae: The viruses and their replication, 1996, 931-960, Lippincott-Raven

Publisher). 이것은 상기 다이뉴클레오타이드 CT가 바이러스의 자가복제에 있어서 매우 중요하며, 감염성이 있는 cDNA로부터 생산된 RNA 전사체는 완전한 3'-말단을 가지고 있어야 한다는 것을 제시한다. 따라서, 본 발명자들은 합성된 RNA 전사체가 완전한 3'-말단을 가지고 종결될 수 있는 방법으로 JEV에 대한 역상 유전자 시스템을 디자인하였다. 실제로 본 발명자들은 바이러스와 연관되지 않은 3개 또는 4개의 뉴클레오타이드를 3'-말단에 가지고 있는 RNA 전사체보다 완전한 3'-말단을 가지는 RNA 전사체의 특이적 감염성이 약 10배 더 높다는 것을 보였다.

<64> V. 본 발명은 상기 JEV cDNA 벡터로부터 합성된 RNA 전사체로 형질전환된 세포로부터 얻어진 재조합된 JEV 바이러스(recombinant JEV virus)를 제공한다.

<65> 본 발명에서는 상기 JEV 전체-길이의 감염성이 있는 cDNA로부터 합성된 JEV RNA 전사체로 형질전환된 세포로부터 합성된 JEV(synthetic JEV) 바이러스가 생산된다. 형질전환된 세포들은 JEV 바이러스의 감염에 의해 유도되는 강한 세포변성효과(cytopathic effect)를 보여주며, 상기 형질전환된 세포로부터 얻어진 합성 JEV(synthetic JEV)바이러스들은 플라크의 형태(plaque morphology), cytopathogenicity, 성장 패턴, 바이러스 단백질의 발현, 및 바이러스 RNA 합성의 관점에서 최초의 모 바이러스(parental virus)인 CNU/LP2 바이러스와 구별할 수 없고(도 5 참조), 높은 바이러스 타이터를 가지는 합성 JEV 바이러스 자손(progeny)을 배출한다. 또한, JEV cDNA 상에 위치지정 돌연변이를 유도하여 *E. coli*에서 감염성이 있는 JEV cDNA를 분자 유전학적으로 조작함으로써 바이러스 돌연변이체가 제조될 수 있다. 따라서, 본 발명의 감염성이 있는 JEV cDNA를 이용한 역상 유전자 시스템은 JEV 게놈의 복제 메커니즘에 대한 유전자 분석 연구에 유용하게 사용될 수 있다.

<66> VI. 본 발명은 상기 JEV cDNA를 포함하는 JEV 발현 벡터를 제공한다.

<67> 본 발명은 JEV cDNA가 포유동물에서 발현 벡터로 사용될 수 있는 용도를 제공한다. 최근 RNA 바이러스의 일원인 알파바이러스(alphavirus)는 일반적으로 생명과학 및 의학분야에서 사용되는 다양한 동물세포에서 복제된다는 장점 때문에 세포배양 및 생체내에서 포유동물세포 발현벡터로 성공적으로 개발되어 사용되어 왔다(Agapov et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, 95, 12989-12944; Frolov et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, 93, 11371-11377; Schlesinger, *Trends Biotechnol.*, 1993, 11, 18-22). JEV도 인간, 마우스, 원숭이, 돼지, 및 햄스터로부터 유래된 다양한 종류의 포유동물세포에서 자가복제할 수 있음이 보고된 바 있다(Burke and Monath, *Flaviviruses*, 2001, 1043-1125, Lippincott Williams & Wilkins Publishers). 이러한 성질은 JEV가 포유동물세포에서 다양한 종류의 이형 유전자 발현벡터로 유용하게 사용될 수 있음을 뜻한다. 즉, 전체-길이의 감염성이 있는 JEV cDNA를 발현벡터로써 사용하여 이형 유전자를 JEV cDNA상에 삽입하면, 이형 유전자가 포함된 RNA 전사체가 시험관내 전사반응과정을 통해서 생성되고, 이들은 세포내로 형질전환되었을 때 자가복제할 수 있으므로 다량의 외래 단백질을 제조할 수 있다.

<68> 이형 유전자를 발현하기 위한 발현 카세트는 JEV 3'NTR 시작부위에 삽입하는 것이 바람직하다. 이형 유전자 발현 카세트를 JEV 3'NTR 시작부위에 삽입한 이유는 CNU/LP2 뿐만 아니라 전체 염기서열이 밝혀진 세 개의 JEV 바이러스주(Williams et al., *J. Gen. Virol.*, 2000, 81, 2471-2480; Nam et al., *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 2001, 65, 388-392; Jan et al., *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1996, 55, 603-609)에서, 9-25 bp의 작은 결실이 바이러스 3'NTR 시작부위에서 관찰되었는데, 이것은 상기 부위가 이형 유전자를 삽입시키기 위한 좋은 부위가 될 수 있

음을 제시하기 때문이다. 따라서, 본 발명에서 개발된 감염성이 있는 JEV cDNA는 포유동물세포를 포함한 다양한 종류의 세포에서 원하는 이형 유전자의 신속한 발현을 위한 발현벡터로 유용하게 사용될 수 있다.

<69> VII. 본 발명은 상기 JEV 발현벡터를 이용하여 이형 유전자(heterologous gene)를 발현시키는 방법을 제공한다.

<70> 본 발명의 이형 유전자를 발현시키는 방법은

<71> 1) JEV cDNA 발현벡터에 이형 유전자를 삽입시켜 재조합된 JEV cDNA 발현벡터를 제조하는 단계;

<72> 2) 상기 재조합된 JEV cDNA 발현벡터로부터 JEV RNA 전사체를 제조하는 단계;

<73> 3) 상기 JEV RNA 전사체를 숙주세포에 형질전환시켜 형질전환체를 제조하는 단계;

<74> 4) 형질전환체를 배양하여 외래 단백질을 발현시키는 단계로 구성된다.

<75> 원하는 이형 유전자를 원하는 세포내에서 발현시키기 위해서는 원하는 이형 유전자를 세포내로 전달(delivery)시켜줄 발현벡터(expression vector)가 필요하다. 이 발현벡터를 적당한 숙주세포에 형질전환시킴으로써 원하는 이형 유전자의 발현을 기대할 수 있다. 본 발명에서는 전체-길이의 감염성이 있는 JEV cDNA가 포유동물세포(mammalian cell)를 포함한 다양한 종류의 세포들에 이용될 수 있는 이형 유전자 발현벡터(heterologous gene expression vector)로 사용될 수 있음을 확인하였다.

<76> 본 발명자들은 상기에서 기술한 방법으로 GFP(green fluorescent protein)와 LUC(luciferase) 유전자를 가진 전체-길이의 감염성이 있는 JEV cDNA를 재조합하였다. 이렇게 재조합된 JEV cDNA로부터 합성된 JEV RNA 전사체를 BHK-21 세포내에 형질전환시킨 후, 배양상 등액으로부터 GFP와 LUC 유전자를 포함한 재조합된 JEV 바이러스 JVFLx/GFP/*Xba*I^{MBN} 및 JVFLx/LUC/*Xba*I^{MBN}를 제조하였다. 이렇게 생산된 재조합 JEV 바이러스(recombinant JEV)로부터 GFP와 LUC 유전자의 발현여부는 일반적으로 생명과학 및 의학분야에서 많이 사용되는 다양한 동물 세포주(BHK-21, Vero, NIH-3T3, ST, HeLa, MDCK, CRFK, B103, 및 SHSY-5Y)에 감염시킴으로써 관찰하였다. 그 결과, 바이러스 게놈 RNA에 삽입된 GFP 또는 LUC 유전자는 테스트한 모든 종류의 세포에서 발현됨을 관찰할 수 있었다(표 4 참조). 따라서, 재조합된 JEV cDNA, JEV RNA 전사체, 및 재조합된 JEV 바이러스는 다양한 종류의 세포내에서 외래 이형 유전자의 발현을 위한 벡터로써 유용하게 사용될 수 있음을 확인하였다.

<77> 본 발명의 전체-길이의 JEV 게놈 RNA 및 상기 게놈 RNA에 대한 감염성이 있는 JEV cDNA는 신경침입성 및 병원성에 관여하는 JEV 유전자를 동정하는 것뿐만 아니라, JEV의 복제, 전사 및 번역에 관련된 분자생물학적인 메카니즘의 연구에 사용될 수 있으며, 또한 일본 뇌염의 치료제, 치료용 또는 예방용 백신, 진단시약 및 진단용 기구 등의 개발에도 유용하게 사용될 수 있고, 아울러 진핵세포에서 이형 유전자의 발현 벡터로 유용하게 사용될 수 있다.

<78> 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

<79> 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

<80> <실시예 1> JEV 바이러스의 분리

<81> <1-1> 사용한 세포주 및 바이러스

<82> BHK-21 세포주는 로크펠러 대학의 Charles M. Rice 박사로부터 제공받았으며, 10% fetal bovine serum(FBS), 2 mM L-글루타민, 비타민 및 항생제를 포함하는 α -MEM(minimum essential medium)에서 배양 유지되었다. 세포의 배양에 사용되는 모든 시약들은 Gibco/BRL 사(Gibco/BRL Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD)로부터 구입하였다. JEV의 한국분리주인 K87P39(Chung et al., *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1996, 55, 91-97)는 국립보건원(Korean National Institute of Health)으로부터 분주받았다. JEV K87P39 바이러스주는 1987년 한국의 야생 모기로부터 분리된 것이며 새끼(suckling) 마우스의 뇌에서 5차례 계대배양(passage)되었다. 황열병 바이러스(yellow fever virus) YF17D 바이러스주는 감염성이 있는 cDNA pACNR/YF17D(Charles M. Rice로부터 제공받음)로부터 하기에 기술된 방법과 같이 SP6 RNA 폴리머라제를 이용한 시험관내 런-오프(run-off) 전사반응에 의하여 제조되었다.

<83> <1-2> 플라크의 분리 정제(plaque purification)

<84> JEV K87P39 바이러스에 감염된 수용성 BHK-21 세포 위에 10% FBS 및 0.5% SeaKem LE 아가로즈(FMC BioProducts, Rockland, Maine)를 포함하는 MEM 배양액으로 덮은 후 5% CO₂, 37°C가 유지되는 배양기에서 배양하였다. 3 내지 4일 동안 배양한 후 감염된 세포들은 3.7% 포르

알데하이드로 실온에서 4시간 고정시킨 다음 덮혀있는 아가로즈를 제거하고 크리스탈 바이올렛(crystal violet)으로 염색하여 플라크를 나타내었다. 상기에 언급한 플라크 에세이(plaque assay) 결과, K87P39 바이러스는 혼합된 다양한 크기의 플라크들을 나타내었다(도 1의 A, K87P39-infected). 따라서, JEV K87P39 바이러스로부터 일정한 크기의 큰 플라크로 나타나는 JEV 바이러스주를 분리하기 위해서 하기에 설명한 플라크 정제(plaque purification) 방법으로 분리하였으며, CNU/LP2라 명명하였다. K87P39 바이러스에 감염된 수용성 BHK-21 세포위에 10% FBS 및 0.5% SeaKem LE 아가로즈(FMC BioProducts, Rockland, Maine)를 포함하는 MEM 배양액으로 덮은 후 5% CO₂, 37℃가 유지되는 배양기에서 3 내지 4일 동안 배양하였다. 배양 후, 각각의 플라크를 멸균된 파스퇴르 피펫으로 선택한(pick) 후 1 ml의 α -MEM 배양액과 함께 4℃에서 2시간동안 아가로즈로부터 바이러스를 용리(elution)하였다. 용리된 바이러스(elute)는 한차례만 BHK-21 세포에서 증폭하여 JEV CNU/LP2 바이러스의 스탁(stock)으로 사용할 때까지 -80℃에 보관하였다.

<85> 이렇게 분리된 JEV CNU/LP2 바이러스가 BHK-21 세포에 감염되었을 때 나타나는 플라크 형태를 JEV K87P39와 비교하기 위해서 상기에서 언급한 플라크 에세이(plaque assay)를 수행하였다. 그 결과, JEV K87P39 바이러스가 감염된 BHK-21 세포에서는 혼합된 다양한 크기의 플라크들을 관찰할 수 있었다(도 1의 A, K87P39-infected). 반면에, CNU/LP2 바이러스가 감염된 BHK-21 세포에서는 일정한 크기의 큰 플라크들을 관찰할 수 있었다(도 1의 A, CNU/LP2-infected). 또한 BHK-21 세포뿐 만 아니라, Vero 세포를 이용하여 플라크 형태를 비교하였을 때에도 상기와 같은 결과를 관찰할 수 있었다(도 1의 B).

<86> <1-3> 면역형광(immunofluorescence)

<87> 감염된 BHK-21 세포에서 JEV 바이러스 단백질의 발현을 동초점 현미경(confocal microscopy)으로 조사하기 위하여, 본 발명자들은 2×10^5 세포를 4-웰 챔버 슬라이드에 분주하여 12시간동안 배양시킨 후, mock-감염시키거나 또는 원래의(original) JEV K87P39 바이러스주, JEV CNU/LP2 분리주(isolate) 또는 YF17D 바이러스주로 1 MOI(multiplicity of infection)에서 18시간동안 감염시켰다. JEV 바이러스 단백질에 대한 면역염색을 위하여, 먼저 0.37%(v/v)의 포름알데히드가 첨가된 PBS와 함께 25℃에서 30분간 배양함으로써 세포를 고정화시켰다. 다음으로 PBS를 이용하여 세포를 세척한 후, 0.2%(v/v) 트리톤 X-100가 첨가된 PBS로 37℃에서 10분간 침투시켰다(permeabilized). 다시 PBS로 세포를 네차례 세척한 후 PBS에서 15분간 재수화시키고(rehydrated), 5%(w/v) BSA를 포함하는 PBS로 37℃에서 1시간동안 블록시켰다. 다음으로, 1:500 희석된 JEV에 특이적인 마우스 과면역 복수액으로 세포를 25℃에서 2시간동안 배양시키고 PBS로 세차례 세척한 후, 1:500 희석된 FITC-결합된 염소 항-마우스 IgG(Jackson ImmunoResearch Labs Inc.)로 25℃에서 2시간동안 배양시킨 후 PBS로 다시 세차례 세척하였다. 그 후, 세포의 핵을 시각화하기 위하여 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 프로피디움 아이오다인 및 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 RNase A를 포함하는 PBS로 37℃에서 30분간 세포를 배양시킨 후, 80% 글리세롤로 마운팅(mounting)을 실시하였다. 63X 대물렌즈(objective)가 장착된 Zeiss Axioskop 동초점 현미경에서 Bio-Rad MRC 1024 및 LaserSharp 소프트웨어를 이용하여 이미지를 얻었다.

<88> 그 결과, CNU/LP2-감염된 BHK-21 세포의 핵 주변막(perinuclear membrane)에서 JEV 바이러스 단백질의 발현을 관찰하였고(도 1의 C, CNU/LP2-infected), K87P39-감염된 BHK-21 세포의 경우에도 유사하였다(도 1의 C, K87P39-infected). 상기 형광염색은 mock-감염된 BHK-21 세포(도 1의 C, Mock-infected) 또는 JEV와 매우 유사한 플라비바이러스인 황열병 바이러스 YF17D로 감염된 BHK-21 세포(도 1의 C, YF17D-infected)에서는 관찰되지 않았다. 신경세포주

인 SHSY-5Y(인간) 및 B103(마우스), 비신경세포주인 Vero(원숭이) 및 MDCK(개)을 포함하는 다양한 동물 세포주에 대한 CNU/LP2 감염 결과, 배양 상등액에서 높은 바이러스 타이터(10^6 - 10^7 PFU/ml)가 관찰되었다. 따라서, 본 발명자들은 JEV CNU/LP2를 전체-길이의 감염성이 있는 JEV cDNA의 합성을 위한 모 바이러스주(parental strain)로 사용하였다.

<89> <실시예 2> 완전한 JEV 게놈 RNA의 뉴클레오타이드 염기서열 분석

<90> 본 발명자들은 제조사의 지침에 따라 300 μ l의 TRIzol LS 시약(Gibco/BRL)을 사용하여 100 μ l의 바이러스를 포함하는 배양액으로부터 바이러스 게놈 RNA를 추출한 후, 20 μ l의 RNase가 제거된 물에 재부유시켰다. 바이러스 게놈 RNA의 완전한 염기서열을 분석하기 위하여, 5'-말단 및 3'-말단을 포함하는 전체 바이러스 게놈RNA를 긴(long) RT-PCR 방법을 이용하여 다섯 개의 증폭하는 cDNA(JVF, JVM, JVR, JV3NTR, 및 JV35NTR)로 증폭시켰다(도 2). cDNA 합성 및 PCR 증폭에 사용된 올리고뉴클레오타이드는 진뱅크(GenBank) 데이터베이스에 염기서열이 모두 밝혀져 있는 16개의 JEV 바이러스 게놈 RNA(CH2195LA, CH2195SA, FU, GP78, HVI, JaGAr01, JaOArS982, K94P05, Vellore P20778, p3, SA(A), SA(V), SA14, SA14-14-2, TC, 및 TL 바이러스주)에 공통적인(consensus) 염기서열에 기초하여 디자인하였다.

<91> <2-1> JEV 게놈 RNA의 염기서열 분석

<92> 도 2의 A에 나타난 것과 같이 1-3,865 뉴클레오타이드의 JVF 앰플리콘(amplicon)을 증폭하기 위하여, JEV 게놈의 3,986-4,003 뉴클레오타이드와 상보적인

서열번호 1로 기재되는 프라이머 J7을 cDNA 합성에 사용하였다. JVF PCR 증폭을 위한 프라이머들은 하기와 같다: 1-18 뉴클레오타이드에 상보적인 서열번호 2로 기재되는 프라이머 J8; 및 3,845-3,865 뉴클레오타이드에 상보적인 서열번호 3으로 기재되는 프라이머 J6. 3,266-8,170 뉴클레오타이드의 JVM 앰플리콘의 경우에는 8,150-8,170에 상보적인 서열번호 4로 기재되는 프라이머 J4가 cDNA 합성을 위하여 사용되었다. JVM PCR 증폭을 위한 프라이머는 하기와 같다: 3,266-3,283 뉴클레오타이드에 상보적인 서열번호 5로 기재되는 프라이머 J20; 및 프라이머 J4. 7,565-10,893 뉴클레오타이드의 JVR 앰플리콘의 경우에는 cDNA 합성을 위하여 10,947-10,967 뉴클레오타이드에 상보적인 서열번호 6으로 기재되는 프라이머 J1이 사용되었다. JVR PCR 증폭을 위한 프라이머는 하기와 같다: 7,565-7,582 뉴클레오타이드에 상보적인 서열번호 7로 기재되는 프라이머 J12; 및 10,870-10,893 뉴클레오타이드에 상보적인 서열번호 8로 기재되는 프라이머 J2. 표준 RT 반응은 10 μ l의 추출된 바이러스 RNA, 5 pmol의 상기에서 언급한 적당한 프라이머, 100 U의 Superscript II RT(Gibco/BRL), 40 U의 RNaseOUT(Gibco/BRL), 0.1 mM의 DTT, 10 mM의 dNTP 혼합액 및 제조사로부터 공급된 RT 버퍼(Gibco/BRL)를 포함하는 20 μ l의 반응 혼합액에서 수행되었다. 반응 혼합액은 37°C에서 1시간 동안 배양되었으며, 이후 70°C에서 15분간 가열시켰다. 5 μ l 당량(aliquot)의 RT 혼합액을 Pyrobest DNA 중합효소(Takara Bio Inc., Shiga, Japan) 및 상기에서 언급한 적당한 프라이머 쌍을 PCR 증폭을 위하여 사용하였다. PCR 반응은 94°C에서 30초간 변성(denaturaton)시키고, 60°C에서 30초간 어닐링(annealing) 시킨 후 72°C에서 5분간 중합(polymerization) 시키는 과정을 30회 반복 실시한 후, 72°C에서 10분간 최종적으로 연장시켰다. 클로닝하는 동안에 일어날 수 있는 선택 편향(selection bias)을 피하기 위하여, PCR 증폭산물의 클로닝되지 않은 앰

플리콘을 사용하여 직접적으로 자동 3700 DNA 서열분석기를 사용하여 양쪽 방향 모두 시퀀싱함으로써 염기서열분석을 수행되었다.

<93> 그 결과, 3'-말단 및 5'-말단 염기서열을 제외한 서열번호 9로 기재되는 JEV의 전체 염기서열을 결정하였다.

<94> <2-2> JEV 게놈 RNA의 3'-말단 염기서열의 결정

<95> JEV CNU/LP2 게놈 RNA의 3'-말단의 염기서열을 분석하기 위하여, 본 발명자들은

서열번호 10으로 기재되는 합성 올리고뉴클레오타이드 T를 바이러스 게놈 RNA의 3'-말단에 접합시킴으로써 cDNA 합성 및 PCR 증폭을 위한 프라이머 결합 부위를 제공하였다(Kolykhalov et al., *J. Virol.*, 1996, 70, 3363-3371). 이 방법은 C형 간염 바이러스 게놈 RNA의 매우 보존된 3'-말단의 염기서열을 분석하기 위하여 성공적으로 사용되었다(Kolykhalov et al., , 1996, 70, 3363-3371). 올리고뉴클레오타이드 T의 3'-말단은 말단(terminal) 데옥시뉴클레오타이드 트랜스퍼라제(Takara)를 이용하여 ddATP를 삽입함으로써 최초로 변형되었으며, 이렇게 함으로써 올리고뉴클레오타이드 T의 분자내(intramolecular) 및 분자간(intermolecular) 접합이 일어나지 않도록 하였다. 또한, 올리고뉴클레오타이드 T의 5'-말단은 T4 폴리뉴클레오타이드 인산화효소(Takara)에 의하여 인산화되었다. 이후, T4 RNA 접합효소(ligase, New England Biolabs, Inc., Beverly, MA)을 이용하여 5'-인산화되고 3'-변형된 올리고뉴클레오타이드 T를 바이러스 게놈 RNA의 3'-말단에 접합시켰다. 20 μ l의 접합 반응 혼합액은 10 U의 T4 RNA 접합효소, 40 U의 RNaseOUT, 10 pmol의 올리고뉴클레오타이드 T, 바이러스 게놈 RNA 및 제조사(NEB)로부터 제공된 버퍼를 포함한다. 16°C에서 12시간동안 배양한 후, 접합된 바이러스 RNA를 페놀로 추출하고 에탄올로 침전시킨 후 20 μ l의 RNase가 제거된 물에 재부유시켰다. 순차적으로, 올리고뉴클레오타이드 T와 상보적인 서열번호 11로 기재되는 올리고뉴클레오타이드 TR을 사용하여 이전에 기술된 방법에 따라 10 μ l의 올리고뉴클레오타이드와 접합된 바이러스 RNA를 cDNA 합성에 사용하였다. 합성된 cDNA의 증폭은 뉴클레오타이드 10,259-10,276에 상보적인 서열번호 12로 기재되는 프라이머 J35 및 프라이머 TR을 사용하여 수행하였다. PCR을 위하여, 5 μ l 당량(aliquot)의 RT 혼합액을 Pyrobest DNA 중합효소를 사용하여 94°C에서 30초, 60°C에서 30초, 72°C에서 1분간 30회 반복 실시한 후, 최종적으로 72°C에서 10분간 연장시켰다. PCR 반응 혼합액의 조성은 상기에서 기재한 조성파 동일하게 사용하였

다. 양성-센스 및 음성-센스 프라이머에 각각 도입된 *Hind*III 및 *Eco*RI 인식 부위를 사용하여 pRS2 벡터(Charles M. Rice로부터 제공받음)에 상기에서 합성된 cDNA JV3NTR 앰플리콘을 클로닝시켰다(도 2의 B).

<96> 아가로스 젤 전기영동 결과, 상기에서 증폭된 PCR 산물은 두 개의 밴드로 이동하였으며, 큰 밴드는 약 700 bp, 작은 밴드는 약 450 bp의 크기를 가졌다(도 2의 C). 두 밴드 모두 정제된 후 클로닝하였으며, 각각 큰 밴드 및 작은 밴드를 포함하는 20 내지 10개의 무작위로 선별된 클론들을 이용하여 JEV CNU/LP2의 3'-말단 염기서열을 분석하였다. 전체 서열이 밝혀진 대부분의 JEV 분리주의 경우에서 보고된 것과 마찬가지로, 본 발명자들은 큰 삽입체(약 700 bp)를 가진 모든 클론들의 바이러스 게놈이 -GATCT¹⁰⁹⁶⁸로 끝난다는 것을 발견하였다. 반면에, 작은 삽입체(약 450 bp)를 가진 모든 클론들은 뉴클레오타이드 10,684에서 종결되어 큰 밴드보다 284 bp 더 짧은 밴드를 가졌다. 작은 삽입체(약 450 bp)의 경우 바이러스 게놈 RNA의 3'-말단에 284개의 뉴클레오타이드를 포함하고 있지 않기 때문에, 전체-길이의 JEV cDNA의 결합(assembly) 과정 동안 본 발명자들은 큰 삽입체(약 700 bp)의 뉴클레오타이드 염기서열을 사용하였다.

<97> <2-3> JEV 게놈 RNA의 5'-말단 염기서열의 결정

<98> JEV CNU/LP2 게놈 RNA의 5'-말단의 염기서열은 자가-접합(self-ligation)된 바이러스 RNA를 이용하여 결정하였다(Campbell and Pletnev,

Virology, 2000, 269, 225-237). 먼저, 담배 산 파이로포스파타제(tobacco acid pyrophosphatase, TAP)를 사용하여 바이러스 게놈 RNA의 캡 구조를 절단하였다. 20 μ l의 절단 반응액은 10 U의 TAP(Epicentre Technol. Co., Madison, WI), 10 μ l의 바이러스 RNA 및 제조사(Epicentre Technol. Co.)로부터 공급된 버퍼를 포함한다. 37°C에서 1시간동안 배양한 후, TAP 처리된 바이러스 RNA를 페놀로 추출하고 에탄올로 침전시킨 후, RNase가 제거된 20 μ l의 물에 재부유시켰다. 캡이 제거된(decapped) 바이러스 RNA의 절반(10 μ l)을 상기에서 기술한 바와 같이 T4 RNA 접합효소를 이용하여 20 μ l의 반응 혼합액에서 자가-접합시켰다. cDNA 합성을 위하여 자가-접합된 바이러스 RNA의 1/4(5 μ l)를 사용하였으며, 이때 뉴클레오타이드 215-232와 상보적인 서열번호 13으로 기재되는 프라이머 J40을 사용하였다. 이렇게 합성된 첫 번째 사슬(first-strand) cDNA는 뉴클레오타이드 164-181에 상보적인 서열번호 14로 기재되는 프라이머 J39 및 프라이머 J35를 사용하여 PCR 증폭하였다(도 2의 D). 아가로스 젤 전기영동 결과, 증폭된 산물은 약 850 bp의 단일 밴드임을 확인하였다(도 2의 E). 증폭된 cDNA JV35NTR 앰플리콘을 *ApoI* 및 *SpeI*을 사용하여 절단시킨 후, *ApoI* 및 *XbaI*으로 절단된 pRS2 벡터에 접합시켜 pRS2/JV3'5'을 제조하였다.

<99> PCR 앰플리콘들을 클로닝한 후, 무작위로 선별된 12개의 클론들의 염기서열을 분석한 결과, 12개의 모든 클론에서 바이러스 3'-말단의 염기서열 -GATCT¹⁰⁹⁶⁸ 다음에 5'-말단의 염기서열 ¹AGAAGT- 가 연결되어있음을 알 수 있었다(도 2의 B 및 도 2의 C 참조). 또한, 클로닝되지 않은 PCR 앰플리콘의 직접적인 염기서열분석에 의해서도 동일한 결과를 얻을 수 있었다. 따라서, 본 발명자들은 CNU/LP2 분리주(isolate)의 완전한 뉴클레오타이드 염기서열이 서열번호 15로 기재되는 것을 확인하였다.

<100> <실시예 3> 전체-길이의 감염성이 있는 JEV cDNA의 제조

<101> JEV CNU/LP2 게놈 RNA에 대한 전체-길이의 감염성이 있는 cDNA를 클로닝하기 위한 과정에서 *E. coli*의 높은-카피-수(high-copy-number)의 플라스미드를 벡터로 사용한 경우 바이러스 게놈의 특정한 부위에서 유전자 재배열(genetic rearrangement)이 일어나기 때문에, 감염성이 있는 JEV cDNA는 현재까지 합성되지 않았다. 또한, 상기와 같은 어려움은 다른 플라비바이러스의 경우에도 존재하는 것으로 보고된 바 있다(Campbell and Pletnev, *Virology*, 2000, 269, 225-237; Polo et al., *J. Virol.*, 1997, 71, 5366-5374; Gritsun and Gould, *Virology*, 1995, 214, 611-618; Sumiyoshi et al., *J. Infect. Dis.*, 1995, 171, 1144-1151; Sumiyoshi et al., *J. Virol.*, 1992, 66, 5425-5431; Rice et al., *New Biol.*, 1989, 1, 285-296). 또한, *E. coli*의 낮은-카피-수(low-copy-number)의 플라스미드를 벡터로 사용한 경우에도 높은-카피-수(high-copy-number)의 플라스미드를 사용할 때와 마찬가지로 유전자 재배열(genetic rearrangement)이 일어났으며, 이와 더불어 낮은 플라스미드 양 때문에 조작하기에 많은 어려움이 있었다. 따라서, 본 발명자들은 BAC(bacterial artificial chromosome)인 pBeloBAC11 플라스미드를 벡터로 사용함으로써 JEV 전체-길이의 감염성이 있는 cDNA를 합성하고자 하였다.

<102> <3-1> 세 개의 JEV cDNA 앰플리콘의 서브클로닝

<103> 본 발명자들은 표준 절차에 따라 재조합 DNA 기술을 사용하였다(Sambrook et al., *Molecular cloning*, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory). 먼저, 완전한 뉴클레오타이드 염기서열을 분석하기 위하여 사용된 세 개의 중첩하는 cDNA 앰플리콘(JVF, JVM 및 JVR)을

pBeloBAC11 플라스미드의 유도체인 서열번호 42로 기재되는 pBAC/SV에 각각 서브클론(subclone)하였다. 즉, 3,863 bp 크기의 JVF 앰플리콘의 *RsrII-AvrII* 절편, 4,717 bp의 JVM 앰플리콘의 *BspEI-MluI* 절편 및 3,326 bp의 JVR 앰플리콘의 *RsrII-BglIII* 절편을 동일한 제한효소로 절단시킨 후 pBAC/SV 플라스미드에 각각 삽입시켰다. 그 결과, pBAC/JVF, pBAC/JVM, 및 pBAC/JVR 서브클론이 제조되었다. 상기 BAC 플라스미드를 *E. coli* DH10B 세포에서 성장시킨 후 삽입된 세 개의 JEV cDNA 앰플리콘들의 염기서열을 각각 분석하였다. 세 개의 서브클론에 클로닝된 모든 JEV cDNA의 뉴클레오타이드 염기서열은 JVR에 존재하는 NS5 유전자의 염기 치환($T^{8906} \rightarrow C$)을 제외하고는 모바이러스(parental virus)인 CNU/LP2의 것과 동일하였다. 상기 치환은 단백질 번역의 관점에서는 침묵(silent)하며, 무작위로 선별된 8가지 개별 클론의 염기서열이 8,906 뉴클레오타이드 위치에서 모두 T 잔기를 보였기 때문에 클로닝 과정에서 이러한 염기 치환이 발생한 것으로 추측된다. $T^{8906} \rightarrow C$ 치환이 대응하는 아미노산의 서열을 변형시키지는 않지만, 이러한 뉴클레오타이드 서열의 변화가 바이러스의 복제에 영향을 미칠 수는 있기 때문에(van Dinten et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, 94, 991-996), 본 발명자들은 다시 T 잔기로 치환시켜 원래의 염기서열을 가지도록 하기 위해서 $T^{8906} \rightarrow C$ 치환을 포함하는 8,827-9,142에 대응하는 315 bp *ApaI-HindIII* 절편을 재클로닝함으로써 교정(correct)되었으며, 그 결과 pBAC/JVRR이 제조되었다. *E. coli* DH10B 균주에서의 조작 및 증식과정에서, 모든 서브클론의 JEV cDNA는 유전학적으로 안정한 채로 유지되었다.

<104> <3-2> 5'-말단에 SP6 프로모터의 도입

<105> SP6 프로모터 전사 출발점(start)을 전체-길이의 JEV cDNA 5'-말단에 정확하게 삽입시키기 위하여, 본 발명자들은 pBAC/JVF를 변형시켰다. 먼저,

서열번호 16으로 기재되는 프라이머 J41 및 SP6 프로모터의 음성-센스 서열에 해당하는 서열번호 17로 기재되는 프라이머 J43을 사용하여 pBAC/SV를 PCR하고, 또한 서열번호 18로 기재되는 프라이머 J42 및 서열번호 19로 기재되는 프라이머 J40을 사용하여 pBAC/JVF를 PCR함으로써 두 개의 PCR 앰플리콘을 합성하였다. 상기 두 개의 절편을 프라이머 J41 및 J40을 사용하여 PCR을 수행함으로써 융합시켰다. 그 결과로 생성된 앰플리콘을 *PacI* 및 *PmeI*을 사용하여 절단시킨 후 동일한 *PacI* 및 *PmeI* 효소로 절단된 pBAC/JVF에 접합시켜서 pBAC^{SP6}/JVF를 생성하였다.

<106> <3-3> SP6 프로모터를 포함하는 JEV 전체-길이의 cDNA 제조

<107> 본 발명자들은 pBAC/JVRR을 엔지니어링하여 JEV 바이러스 3'-말단의 뉴클레오타이드 염기서열이 *XhoI* 또는 *XbaI*의 유일한(unique) 제한효소 인식 부위를 가지도록 하였다. 바이러스 게놈 RNA의 3'-말단에 유일한 *XhoI* 인식 부위를 포함하는 pBAC/JVRR/*XhoI* 서브클론을 제조하기 위하여, pRS2/JV3'5'을 서열번호 20으로 기재되는 프라이머 J90 및 *XhoI* 인식 부위를 포함하는 서열번호 21로 기재되는 프라이머 J45를 사용하여 PCR을 수행함으로써 절편 I을 합성하였다. 298-bp *SfiI*-*SpeI* 부위의 절편 I 앰플리콘을 *SfiI* 및 *NheI*으로 절단시킨 pBAC/JVRR에 접합시켜서 pBAC/JVRR/*XhoI* 서브클론을 제조하였다. 바이러스 게놈의 3'-말단에 *XbaI* 인식 부위를 가지는 pBAC/JVRRx/*XbaI* 서브클론을 제조하기 위하여, 먼저 PCR을 이용하여 NS5 유전자의 9,132 뉴클레오타이드에 이미 존재하는 *XbaI* 인식 부위에 침묵(silent) 점 돌연변이(A⁹¹³⁴ → T)를 도입함으로써 제한효소의 인식 부위를 제거하였다. pBAC/JVRRx/*XbaI* 서브클론상에 표시된 "x"는 이 침묵 점 돌연변이(A⁹¹³⁴ → T)를 나타낸다. 구체적으로, pBAC/JVRR을

서열번호 22로 기재되는 프라이머 J31 및 A⁹¹³⁴ → T 치환을 도입시키는 서열번호 23으로 기재되는 프라이머 J47을 이용하여 증폭시켰다. 뉴클레오타이드 8,828-9,143에 대응하는 cDNA 앰플리콘의 315 bp *Apa*I-*Hind*III 부위를 pBAC/JVRR에 클로닝시켜 pBAC/JVRRx를 제조하였다. 다음으로, pBAC/JVRR/*Xho*I의 경우와 동일한 방법을 사용하여 pBAC/JVRRx/*Xba*I 서브클론을 제조하였다. 따라서, 프라이머 J90 및 *Xba*I 부위를 포함하는 서열번호 24로 기재되는 프라이머 J46을 사용하여 pRS2/JV3'5'을 PCR에 의해 증폭함으로써 절편 II를 얻었다. 절편 II 앰플리콘의 298 bp *Sfi*I-*Spe*I 부위를 *Sfi*I 및 *Nhe*I으로 절단시킨 pBAC/JVRRx에 접합시켜서 pBAC/JVRRx/*Xba*I 서브클론을 제조하였다. 단일한 *Xho*I 부위 및 A⁹¹³⁴ → T 치환부위를 포함하는 pBAC/JVRRx/*Xho*I 서브클론을 제조하기 위하여, 절편 I 앰플리콘의 298 bp *Sfi*I-*Spe*I 부위를 *Sfi*I 및 *Nhe*I으로 절단시킨 pBAC/JVRRx에 접합시켜서 pBAC/JVRRx/*Xho*I 서브클론을 제조하였다.

<108> 상기와 같은 방법으로 본 발명자들은 pBAC^{SP6}/JVF, pBAC/JVM, pBAC/JVRR/*Xho*I, pBAC/JVRRx/*Xba*I 및 pBAC/JVRRx/*Xho*I의 다섯 가지 플라스미드를 제조하였다. 상기 플라스미드들은 JEV 게놈 RNA를 증첩하여 나타내며, 하기에 기술한 것과 같이 JEV 전체-길이의 감염성이 있는 cDNA를 합성하는 데 사용되었다. 먼저, pBAC/JVM의 4,717 bp *Bsp*EI-*Mlu*I 절편, pBAC^{SP6}/JVF의 8,970 bp *Bsp*EI-*Xba*I 절편, 및 pBAC/SV의 3,670 bp *Xba*I-*Mlu*I 절편을 접합시킴으로써 pBAC^{SP6}/JVFM 서브클론을 제조하였다. 순차적으로, pBAC^{SP6}/JVFM의 두 가지 절편인 8,142 bp의 *Pac*I-*Sap*I 절편과 4,801 bp의 *Pac*I-*Bsr*GI 절편을 i) pBAC^{SP6}/JVFL/*Xho*I을 제조하기 위하여 pBAC/JVRR/*Xho*I의 5,620 bp *Sap*I-*Bsr*GI 절편과, ii) pBAC^{SP6}/JVFLx/*Xba*I을 제조하기 위하여 pBAC/JVRRx/*Xba*I의 5,622 bp *Sap*I-*Bsr*GI 절편과, 또는 iii) pBAC^{SP6}/JVFLx/*Xho*I을 제조하기 위하여 pBAC/JVRRx/*Xho*I의 5,620 bp *Sap*I-*Bsr*GI 절편과 각각 접합시켰다.

<109> 최종적으로 생성된 세 개의 전체-길이 JEV cDNA 플라스미드는 각각 pBAC^{SP6}/JVFL/*Xho*I, pBAC^{SP6}/JVFLx/*Xho*I 및 pBAC^{SP6}/JVFLx/*Xba*I으로 명명하였으며, 서열번호 43, 서열번호 44, 및 서열번호 45로 기재하였다(도 3의 B). 상기 cDNA 클론들은 모두 바이러스 게놈의 처음(beginning) 부위에 SP6 프로모터 전사출발(transcription start)를 가지며, SP6 RNA 폴리머라제를 사용한 시험관내 전사반응을 통해서 완전한(authentic) 5'-말단을 가지는 합성 RNA 전사체가 생산될 수 있다(도 3의 B, 회색 박스). 런-오프(run-off) 전사 후 바이러스 게놈의 3'-말단을 완전하거나 또는 완전한 것에 가깝게 하기 위하여, 본 발명자들은 *Xho*I 또는 *Xba*I 제한효소 인식 부위를 바이러스 게놈의 말단에 위치시켰다(도 3의 B, 밑줄). 따라서, pBAC^{SP6}/JVFL/*Xho*I은 바이러스 게놈의 말단에 *Xho*I 인식 부위를 가진다. 바이러스 게놈의 NS5 유전자에 이미 *Xba*I 인식 부위가 존재하기 때문에, 바이러스 게놈의 바로 말단에 *Xba*I 인식 부위를 가지게 하기 위하여 NS5 유전자에 존재하는 *Xba*I 인식 부위에 침묵(silent) 점 돌연변이(A⁹¹³⁴ → T)를 도입하여 *Xba*I 인식 부위를 제거하였다. 상기 콘스트럭트(construct)는 pBAC^{SP6}/JVFLx/*Xba*I으로 명명하였으며, 여기에서 'x'는 원래의(original) *Xba*I 인식 부위가 제거된 침묵 점 돌연변이가 존재한다는 것을 의미한다. 세 번째 클론인 pBAC^{SP6}/JVFLx/*Xho*I은 바이러스 게놈의 말단에 런-오프 자리로써 *Xho*I 인식 부위와 A⁹¹³⁴ → T 치환을 모두 포함한다.

<110> 본 발명자들은 JEV cDNA를 포함하는 pBAC^{SP6}/JVFLx/*Xba*I을 2002년 10월 2일부로 한국생명공학연구원 유전자은행에 기탁하였다(수탁번호 ; KCTC 10347BP).

<111> <3-4> T7 프로모터를 포함하는 JEV 전체-길이의 cDNA 제조

- .12> 상기 실시예 <3-3>과 같은 방법으로, 본 발명자들은 SP6-유도된(driven) JEV cDNA와 더불어 세 개의 T7-유도된 전체-길이의 JEV cDNA의 세트를 제조하였다. 먼저, 서열번호 25로 기재되는 프라이머 J81 및 서열번호 26으로 기재되는 프라이머 J80을 사용하여 pBAC/NADLcIn⁻/PAC(Charles M. Rice로부터 제공받음) 유래의 절편을 PCR에 의하여 합성하였다. 또한, 서열번호 27로 기재되는 J42 프라이머 및 서열번호 28로 기재되는 J82 프라이머를 사용하여 pBAC^{SP6}/JVFLx/*Xba*I 유래의 절편을 합성하였다. 상기 두 개의 절편을 프라이머 J81 및 J82를 사용하여 PCR함으로써 융합시켰다. 그 결과 생성된 앰플리콘의 793-bp *Eco*RI-*Spe*I 절편을 *Eco*RI 및 *Xba*I으로 절단시킨 pRS2 벡터에 삽입시켜 pRS2^{T7}/5'JV를 제조하였다. pRS2^{T7}/5'JV의 675 bp *Pvu*I-*Pme*I 절편을 i) pBAC^{T7}/JVFL/*Xho*I을 제조하기 위하여 pBAC^{SP6}/JVFL/*Xho*I의 18,364 bp *Pac*I-*Pme*I 절편과, ii) pBAC^{T7}/JVFLx/*Xho*I을 제조하기 위하여 pBAC^{SP6}/JVFLx/*Xho*I의 18,364 bp *Pac*I-*Pme*I 절편과, 또는 iii) pBAC^{T7}/JVFLx/*Xba*I을 제조하기 위하여 pBAC^{SP6}/JVFLx/*Xba*I의 18,366 bp *Pac*I-*Pme*I 절편과 각각 접합시켰다.
- .113> 생성된 플라스미드는 각각 pBAC^{T7}/JVFL/*Xho*I, pBAC^{T7}/JVFLx/*Xho*I, 및 pBAC^{T7}/JVFLx/*Xba*I으로 명명하였으며, 서열번호 46, 서열번호 47, 및 서열번호 48로 기재하였다(도 3의 C). 각각의 클로닝 단계에서, 제한효소 및 뉴클레오타이드 서열 분석을 광범위하게 실시하여 클로닝된 cDNA의 구조를 분석하였다. 그 결과, 결실 또는 재배열에 따른 삽입체의 구조상의 유전학적 불안정성은 관찰되지 않았다.
- .114> 본 발명자들은 JEV cDNA를 포함하는 pBAC^{T7}/JVFLx/*Xba*I을 2002년 10월 2일부로 한국생명공학연구원 유전자은행에 기탁하였다(수탁번호 ; KCTC 10346BP).

<115> <실시예 4> 전사 및 형질전환

<116> 본 발명자들은 상기에서 합성된 전체-길이의 JEV cDNA를 주형으로 사용하여 시험관내 전사반응에 의하여 합성 JEV RNA 전사체를 생산하였다. 이를 위하여, 100-200 ng의 주형 DNA를 *Xho*I 또는 *Xba*I으로 절단시켜 선형화시킨 후, 제조사(Gibco/BRL)에 의하여 제공된 버퍼, 0.6 mM 캡 유사체 [$m^7G(5')ppp(5')A$ 또는 $m^7G(5')ppp(5')G$, NEB Inc.], 0.5 μ M의 [3H]UTP(1.0 mCi/ml, 50 Ci/mmol, New England Nuclear Corp., Boston, MA), 10 mM의 DTT, 각각 1 mM의 UTP, GTP, CTP 및 ATP, 40 U의 RNaseOUT 및 15 U의 SP6 RNA 폴리머라제(Gibco/BRL)로 구성된 25 μ l의 반응 혼합액에 첨가하였다. 상기 반응 혼합액은 37°C에서 1시간동안 배양하였다. DE-81 여과지(Whatman, Maidstone, UK)에 RNA가 흡수되는 [3H]UTP 함유(incorporation)에 기초하여 RNA를 정량하였다(Sambrook et al., *Molecular cloning*, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory). 그 후, 1 내지 1.5 μ l 당량의 반응 혼합액을 이용하여 아가로스 젤 전기영동을 실시하였다.

<117> 상기에서 합성된 RNA 전사체를 세포내로 형질전환 시키기 위하여, ECM 830 일렉트로포레이터(BTX Inc., San Diego, CA)를 사용하여 제조사의 지침에 따라 세포에 합성 RNA를 일렉트로포레이션시켰다. 간략하게 설명하면, 아포화(subconfluent) 상태의 세포에 트립신을 처리하고 RNase가 제거된 차가운 PBS를 이용하여 세 차례 세척한 후, 2×10^7 세포/ml의 농도로 PBS에 재부유시켰다. 400 μ l 당량의 부유물을 2 μ g의 합성 RNA와 혼합한 후, 이전 실험에서 최적의 조건으로 결정된 조건(980 V, 99- μ s 펄스 길이, 및 5 펄스)에서 세포를 즉시 일렉트로포레이션시켰다. 일렉트로포레이션된 혼합액을 10 ml의 신선한 배양액으로 옮겼다.

<118> 또한, 합성 RNA의 특이적 감염성(specific infectivity)을 정량하기 위하여, 감염 센터 분석(infectious center assay)을 실시하였다. 구체적으로, 런-오프 전사의 경우 JEV cDNA 주

형은 *Xho*I 또는 *Xba*I 제한효소의 절단에 의하여 선형화되었다. $m^7G(5')ppp(5')A$ 캡 구조 유사체의 존재하에서 *Xho*I의 처리에 의하여 선형화된 두 개의 플라스미드(pBAC^{SP6}/JVFL/*Xho*I와 pBAC^{SP6}/JVFLx/*Xho*I)는 SP6 폴리머라제 런-오프 전사로부터 5'-말단에 캡 구조를 가지고 있으며, 3'-말단에 바이러스와 연관되지 않은 CGA 뉴클레오타이드 염기서열을 가지고 있는 합성 RNA가 생산되었다(도 3의 B). 이와 유사하게, *Xba*I-선형화된 pBAC^{SP6}/JVFLx/*Xba*I 플라스미드는 SP6 폴리머라제 런-오프 전사로부터 5'-말단에 캡 구조를 가지고 있으며, 3'-말단에 바이러스와 연관되지 않은 CTAG 뉴클레오타이드 염기서열을 가지고 있는 합성 RNA가 생산되었다. 일렉트로포레이션된 세포들을 순차적으로 10배씩 희석하여 6-웰 플레이트에서 성장하는 감염되지 않은 단층 세포(5×10^5)에 분주하였다. 6시간동안 배양하여 플레이트에 세포를 부착시킨 후, 0.5%의 SeaKem LE 아가로즈를 포함하는 MEM 배지에 상기에서 기술한 방법으로 세포를 배양하였다. 세포를 37°C, 5% CO₂ 조건에서 3 내지 4일간 배양시킨 후, 감염 플라크 센터를 크리스탈 바이올렛(crystal violet) 염색에 의하여 시각화시켰다.

119> 그 결과, 수용성(susceptible) BHK-21 세포가 상기의 합성 RNA로 형질전환되었을 때, 모두 높은 특이적 감염성을 나타내었다(표 3). 즉, 최적의 일렉트로포레이션 조건에서 형질전환된 pBAC^{SP6}/JVFL/*Xho*I, pBAC^{SP6}/JVFLx/*Xho*I 및 pBAC^{SP6}/JVFLx/*Xba*I으로부터 얻은 합성 RNA의 경우, 특이적 감염성이 각각 3.5×10^5 , 4.3×10^5 및 3.4×10^5 PFU/ μg 이었다. 이와 유사한 결과가 T7 폴리머라제 런-오프 전사에 의하여 T7-유도된 JEV cDNA로부터 전사된 합성 RNA에서도 관찰되었다.

<120> 【표 3】

전체-길이의 JEV cDNA로부터 합성된 RNA 전사체의 시험관내 특이적 감염성 및 바이러스 타이터

전사에 사용된 주형 ^a	감염성 ^b (PFU/ μ g of RNA)	바이러스 타이터 ^c (PFU/ml)	
		24 시간	48 시간
pBACSP6/JVFL/ <i>Xho</i> I	3.5×10^5	4.4×10^5	3.6×10^6
pBACT7/JVFL/ <i>Xho</i> I	2.9×10^5	2.0×10^5	2.3×10^6
pBACSP6/JVFLx/ <i>Xho</i> I	4.3×10^5	2.1×10^5	5.2×10^6
pBACT7/JVFLx/ <i>Xho</i> I	3.8×10^5	3.3×10^5	4.1×10^6
pBACSP6/JVFLx/ <i>Xba</i> I	3.4×10^5	3.5×10^5	3.2×10^6
pBACT7/JVFLx/ <i>Xba</i> I	3.0×10^5	2.4×10^5	2.7×10^6
pBACSP6/JVFLx/ <i>Xba</i> I ^{MBN}	3.1×10^6	6.2×10^6	1.4×10^6
pBACT7/JVFLx/ <i>Xba</i> I ^{MBN}	2.7×10^6	5.6×10^6	2.4×10^6

<121> a : 모든 전체-길이 JEV cDNA는 제한효소 처리에 의하여 선형화됨

<122> b : SP6 또는 T7 RNA 중합효소를 사용하여 시험관내 전사 후, BHK-21 세포를 형질전환시키기 위하여 샘플을 사용함

<123> <4-1> JEV cDNA로부터 합성된 JEV RNA 전사체의 3'-말단에 바이러스와 연관되지 않은 뉴클레오타이드 염기서열을 포함하지 않는 JEV RNA 전사체의 합성

<124> 어떤 플라비바이러스의 경우, 감염성이 있는 cDNA로부터 전사된 합성 RNA의 3'-말단에 바이러스와 연관되지 않은 서열이 존재하면 특이적 감염성이 감소되거나 또는 없어진다 (abrogate)는 것이 보고되었다(Yamshchikov et al., *Virology*, 2001, 281, 294-304). 상기 보고에 근거하여, 본 발명자들은 추가로 존재하는 CTAG 뉴클레오타이드를 전사반응 전에 제거하기 위하여 *Xba*I-선형화된 pBACSP6/JVFLx/*Xba*I 플라스미드를 녹두 뉴클레아제(mung bean nuclease, MBN)로 처리함으로써 바이러스와 연관되지 않은 뉴클레오타이드 염기서열을 가지고 있지 않는 합성 JEV RNA를 제조하고자 하였다. *Xba*I-선형화되고 MBN-처리된 pBACSP6/JVFLx/

XbaI^{MBN}으로부터 합성된 JEV RNA(도 3의 B, pBAC^{SP6}/JVFLx/*XbaI*^{MBN})를 *XbaI*-선형화되었지만 MBN으로 처리하지 않은 pBAC^{SP6}/JVFLx/*XbaI*(도 3의 B, pBAC^{SP6}/JVFLx/*XbaI*)으로부터 합성된 JEV RNA와 비교하였을 때 pBAC^{SP6}/JVFLx/*XbaI*^{MBN}으로부터 합성된 JEV RNA가 증가된 특이적 감염성을 보였다(표 3, Infectivity). 즉, MBN-처리된 pBAC^{SP6}/JVFLx/*XbaI*^{MBN}으로부터 전사된 RNA의 감염성은 3.1×10^6 PFU/ μ g으로 측정되었는데, 이것은 MBN-처리되지 않은 cDNA 주형 pBAC^{SP6}/JVFLx/*XbaI*으로부터 전사된 RNA의 특이적 감염성인 3.4×10^5 PFU/ μ g보다 약 10배나 높은 것이다(표 3, Infectivity). 또한, pBAC^{T7}/JVFLx/*XbaI*(3.0×10^5 PFU/ μ g) 유래의 RNA들도 MBN 처리 이후에 증가된 감염성을 보였다(2.7×10^6 PFU/ μ g)(표 3, Infectivity). 따라서, 본 발명자들은 높은 감염성을 지닌 합성 JEV RNA 전사체가 생산되기 위해서는 JEV 게놈 RNA에 완전한 (authentic) 3'-말단이 존재해야함을 확인하였다.

<125> 또한, 3 내지 4개의 JEV 바이러스와 연관되지 않은 뉴클레오타이드가 3'-말단에 존재함으로써 인하여 변형된 RNA 전사체의 특이적 감염성은 형질전환된 BHK-21 세포의 배양 상등액에서 수집한 바이러스 타이터(titer)에도 영향을 미쳤다. MBN이 처리되지 않은 pBAC^{SP6}/JVFL/*Xho*I, pBAC^{SP6}/JVFLx/*Xho*I 및 pBAC^{SP6}/JVFLx/*XbaI* 유래의 RNA 전사체로 형질전환된 BHK-21 세포로부터 방출된 바이러스 타이터는 형질전환 후 24시간이 경과했을 때 $2.1-4.4 \times 10^5$ PFU/ml 범위였다(

표 3, Virus titer 24hr). 이 시점에서 형질전환된 세포의 절반만이 여전히 배양 접시에 부착되어 있었는데, 이것은 바이러스에 의해 유도되는 강한 세포변성효과(cytopathic effect)를 보여준다. 상기 타이터는 형질전환 후 48시간이 경과했을 때 $3.2-5.2 \times 10^6$ PFU/ml 범위로 증가하였는데(표 3, Virus titer 48hr), 이 시점에서 대부분의 세포는 죽어서 배양 접시의 바닥에서 떨어졌다. 하지만, MBN-처리된 pBAC^{SP6}/JVFLx/*Xba*I^{MBN} 유래의 RNA 전사체는 형질전환 후 24시간이 경과했을 때 이미 6.2×10^6 PFU/ml에 도달하였고, 이때 대다수의 형질전환된 세포들이 죽었다(표 3, Virus titer 24hr). 상기 타이터는 형질전환후 48시간에 1.4×10^6 PFU/ml로 약간 감소하였다(표 3, Virus titer 48hr). 또한, 상기에서 합성된 T7-유도된 감염성이 있는 JEV cDNA(pBAC^{T7}/JVFL/*Xho*I, pBAC^{T7}/JVFLx/*Xho*I, pBAC^{T7}/JVFLx/*Xba*I, 및 pBAC^{T7}/JVFLx/*Xba*I^{MBN})을 주형으로 사용하여 T7 폴리머라제를 이용한 시험관내 전사반응으로 얻은 합성 JEV RNA 전사체의 경우에도 동일한 패턴의 바이러스 생산이 관찰되었다(표 3).

<126> <실시예 5> 합성 RNA 전사체의 감염성 확인

<127> 본 발명자들은 특이적 감염성이 전체-길이의 JEV cDNA 클론 pBAC^{SP6}/JVFLx/*Xba*I^{MBN}을 주형으로 사용하여 합성된 RNA 전사체로부터 나타난다는 것을 확인하였다(도 4). cDNA 주형 자체로는 감염성이 없었으나(도 4의 A, 레인 5 및 B, Without SP6 Pol), 시험관내 전사반응 동안 DNase I을 처리하면 감염성이 없어지기 때문에 전사 반응 동안에는 완전한 cDNA 주형이 요구된다는 것을 확인하였다(도 4의 A, 레인 2 및 B, DNase During). 완전한 반응 혼합액과 비교하였을 때(도 4의 A, 레인 1 및 B, Without Treatment), 전사 반응 후에 DNase I을 첨가하는

것은 영향을 미치지 않았다(도 4의 A, 레인 3 및 B, DNase After). 그러나, 반응 후 RNase A를 처리하면 전사된 합성 RNA의 감염성이 제거되었다(도 4의 A, 레인 4 및 B, RNase After).

<128> <실시예 6> 전체-길이의 감염성이 있는 JEV cDNA로부터 생산된 합성 JEV 바이러스(synthetic JEV virus)와 모 바이러스(parental virus) CNU/LP2와의 특성 비교

<129> 본 발명자들은 전체-길이의 감염성이 있는 JEV cDNA(pBAC^{SP6}/JVFL/*Xho*I, pBAC^{SP6}/JVFLx/*Xho*I, pBAC^{SP6}/JVFLx/*Xba*I, 및 pBAC^{SP6}/JVFLx/*Xba*I^{MBN}) 주형으로부터 생산된 합성 JEV 바이러스(synthetic JEV virus)와 최초로 cDNA의 제조를 위하여 사용한 모 바이러스(parental virus)인 CNU/LP2를 플라크 형태, 바이러스 성장 키네틱스(growth kinetics), 바이러스 단백질의 합성, 및 바이러스 게놈 RNA의 합성을 각각 비교하였다.

<130> <6-1> 플라크 에세이(plaque assay)에 의한 플라크 형태 비교

<131> 본 발명자들은 BHK-21 세포에 상기의 감염성이 있는 JEV cDNA(pBAC^{SP6}/JVFL/*Xho*I, pBAC^{SP6}/JVFLx/*Xho*I, pBAC^{SP6}/JVFLx/*Xba*I, 및 pBAC^{SP6}/JVFLx/*Xba*I^{MBN}) 주형으로부터 얻어진 합성 JEV 바이러스와 모 바이러스 CNU/LP2를 감염시킨 후 10% FBS 및 0.5% SeaKem LE 아가로스(FMC BioProducts,

Rockland, Maine)를 포함하는 MEM 배양액으로 덮어서 5% CO₂, 37°C가 유지되는 배양기에서 배양하였다. 3 내지 4일 동안 배양한 후, 감염된 세포들은 3.7% 포름알데하이드로 실온에서 4시간 고정시킨 다음 덮혀있는 아가로즈를 제거하고 크리스탈 바이올렛(crystal violet)으로 염색하여 플라크를 시각화하였다. 그 결과, 도 5의 A에서 볼 수 있는 바와 같이, pBAC^{SP6}/JVFL/*Xho*I(접시 1), pBAC^{SP6}/JVFLx/*Xho*I(접시 2), pBAC^{SP6}/JVFLx/*Xba*I(접시 3) 및 pBAC^{SP6}/JVFLx/*Xba*I^{MBN}(접시 4)로부터 생산된 합성 JEV 바이러스로 감염된 BHK-21 세포는 CNU/LP2로 감염된 세포(접시 5)의 경우와 유사하게 동일한 크기의(homogeneous) 큰 플라크를 형성하였다.

<132> <6-2> 바이러스의 성장 키네틱스 비교

<133> 본 발명자들은 BHK-21 세포에 상기의 감염성이 있는 JEV cDNA(pBAC^{SP6}/JVFL/*Xho*I, pBAC^{SP6}/JVFLx/*Xho*I, pBAC^{SP6}/JVFLx/*Xba*I, 및 pBAC^{SP6}/JVFLx/*Xba*I^{MBN}) 주형으로부터 얻어진 합성 JEV 바이러스와 모 바이러스 CNU/LP2를 낮은(0.01 PFU/세포), 중간(1.0 PFU/세포), 및 높은(10 PFU/세포) MOI(multiplicities of infection)로 감염시킨 후, 시간이 경과함에 따라 감염된 BHK-21 세포에서 생산되는 JEV 바이러스의 성장 키네틱스(kinetics)를 분석하기 위하여 세포 배양액을 주기적으로 수집하여 상기에 기술한 플라크 에세이를 통해 바이러스 타이터를 측정하였다. 그 결과, 도 5의 B에서 볼 수 있는 바와 같이, 시간에 따라 축적되는 바이러스 타이터는 본 발명에서 실시한 세 가지 모든 MOI(0.01, 1.0, 및 10)에서 네 가지의 합성 JEV 바이러스(pBAC^{SP6}/JVFL/*Xho*I, pBAC^{SP6}/JVFLx/*Xho*I, pBAC^{SP6}/JVFLx/*Xba*I, 및 pBAC^{SP6}/JVFLx/*Xba*I^{MBN}) 및 모 바이러스 CNU/LP2의 경우에 모두 유사하였다.

<134> <6-3> 웨스턴 블롯 분석을 통한 바이러스 단백질의 합성 비교

<135> 본 발명자들은 상기의 감염성이 있는 JEV cDNA(pBAC^{SP6}/JVFL/*Xho*I, pBAC^{SP6}/JVFLx/*Xho*I, pBAC^{SP6}/JVFLx/*Xba*I, 및 pBAC^{SP6}/JVFLx/*Xba*I^{MBN}) 주형으로부터 얻어진 합성 JEV 바이러스와 모 바이러스 CNU/LP2로 감염된 BHK-21 세포에서 발현되는 JEV 바이러스의 단백질을 비교하였다. 구체적으로, 1 MOI로 감염된 3×10^5 BHK-21 세포를 200 μ l의 샘플 로딩 버퍼(80 mM Tri-HCl(pH 6.8), 2.0% SDS, 10% 글리세롤, 0.1 M DTT, 0.2% 브로모페놀 블루)를 이용하여 용해시킨 후, 용해된 세포(lysate)의 1/10을 5분간 끓인 후 SDS-폴리아크릴아마이드 겔에서 분획화시켰다 (fractionated). 트랜스-블롯(trans-blot) SD 전기영동 전달 세포 기계(electrophoretic transfer cell machine, Bio-Rad Labs Inc. Hercules, CA)를 이용하여 SDS-폴리아크릴아마이드 겔로부터 메탄올로 활성화시킨 폴리비닐리덴 다이플루오라이드 막으로 단백질을 전기적으로 옮긴 후, 세척 용액(0.2% 트윈 20이 첨가된 PBS)에 용해시킨 5% 비지방 분유를 이용하여 실온에서 1시간 동안 막을 블록시켰다. 세척 용액으로 세 차례 세척한 후, 액틴 단백질의 모든 동소체(isoform)의 C-말단에 보존되어 있는 에피토프(epitope)를 인식하는 단클론 항-액틴 항체(A4700, Sigma, St. Louis, MO) 또는 JEV에 특이적인 마우스 과면역성(hyperimmune) 복수액(ascites fluid)(ATCC VR-1259AF)으로 실온에서 2시간동안 막을 배양하였다. 세척 용액으로 막을 세 차례 세척한 후, alkaline phosphatase(AP)와 결합된 염소 항-마우스 IgG(Jackson ImmunoResearch Labs Inc., West Grove, PA)로 실온에서 2시간동안 배양하였다. 막을 세척용액으로 세 차례 세척한 후 PBS로 한번 세척하였다. 막에 존재하는 액틴 또는 JEV 단백질 밴드는 기질인 5-브로모-4-클로로-3-인돌릴-포스페이트 및 니트로블루 테트라졸리움을 막과 함께 배양함으로써 시각화시켰다. 그 결과, 합성 JEV 바이러스 및 모 바이러스 모두 유사한 양과

동일한 패턴의 JEV 바이러스-특이적 단백질을 생산한다는 것을 확인하였다(도 5의 C, 위 패널). 샘플 로딩 대조군으로는 액틴(actin) 단백질을 사용하였으며, 동일한 양의 액틴 단백질이 mock-감염된 세포와 합성 JEV 바이러스 및 모 바이러스로 감염된 세포에 존재함을 확인하였다(도 5의 C, 아래 패널).

:136> <6-4> 노던 블롯 분석을 통한 바이러스 게놈 RNA의 합성 비교

:137> 본 발명자들은 상기의 감염성이 있는 JEV cDNA(pBAC^{SP6}/JVFL/

*Xho*I, pBAC^{SP6}/JVFLx/*Xho*I, pBAC^{SP6}/JVFLx/*Xba*I, 및 pBAC^{SP6}/JVFLx/*Xba*I^{MBN}) 주형으로부터 얻어진 합성 JEV 바이러스와 모 바이러스 CNU/LP2로 감염된 BHK-21 세포에서 발현되는 JEV 바이러스의 RNA를 비교하였다. 구체적으로, 1 ml의 TRIzol 시약(Gibco/BRL)을 사용하여 3×10⁵의 감염된 BHK-21 세포로부터 전체 RNA를 추출하였다. JEV-특이적 RNA를 분석하기 위하여, 추출된 전체 RNA의 1/3에 대하여 노던 블롯 분석을 실시하였다(Sambrook et al., *Molecular cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory). 2.2 M 포름알데히드-1% 아가로스 겔에서 RNA를 전기영동한 후 나일론 막(Amersham Biosciences Inc., Piscataway, NJ)으로 전달하였다. 254 nm 선원의 Stratalinker UV cross-linker(Stratagene, La Jolla, CA)를 사용하여 막에 존재하는 RNA를 막과 상호-연결(cross-link)시킨 후, JEV 게놈의 9,143-9,351 뉴클레오타이드 염기서열에 상보적으로 결합하는 [³²P]CTP-표지된 안티센스 리보프로브(riboprobe)와 함께 배양시킴으로써 JEV-특이적 RNA를 검출하였다. [pBAC^{SP6}/JVFLx/*Xba*I의 209 bp *Hind*III-*Sac*I 절편을 pGEM3Zf(+)에 삽입시켜 pGEM3Zf(+)/JV9143을 제조하였다. pGEM3Zf(+)/JV9143를 *Bam*HI 효소로 절단시켜서 *Bam*HI-선형화된 cDNA 클론으로부터 시험관내 전사반응을 통해서 상기 리보프로브를 합성하였다. T7-MEGascript 키트(Ambion, Austin, TX)를 사용하여 3.12 μM의 [α -³²P]CTP(800 Ci/mmol, Amersham)를 포함하는 20 μl의 반응 혼합액으로부터 제조사의 지침에 따라 상기 *Bam*HI-선형화된 pGEM3Zf(+)/JV9143 클론을 전사시켰다. DNase I을 처리한 후, 전사반응에 포함되지 않은(unincorporated) 리보뉴클레오타이드 트리포스페이트를 제거하기 위하여 반응 혼합액을 Quick Spin G-50 세파덱스 칼럼(Boehringer mannheim)에 적용시켰다.] 배양 용액[5×SSPE(0.9 M NaCl, 50 mM NaH₂PO₄ 및 5 mM EDTA pH 7.7), 5×Denhardt's 시약, 0.5% SDS, 100 μg/ml의 변성된 연어 정충 DNA, 50% 포름아마이드]에서 55℃에서 6시간 동안 막을 전배양시킨 후, 1×10⁷ cpm의 표지된 리보프로브를 포함하는 배양 용액에서 55℃에서 밤새

배양시켰다. $1\times$ SSPE, 0.5% SDS를 사용하여 55℃에서 10분간 세 차례 막을 세척한 후, $0.1\times$ SSPE, 0.5% SDS를 사용하여 10분간 한차례 세척하였다. 바이러스 RNA 밴드를 자가방사선사진 (autoradiography)으로 시각화시킨 후, Molecular Imager(Bio-Rad Lab)를 이용하여 정량하였다. 그 결과, 모든 경우에 있어서 바이러스 RNA의 발현 정도가 유사하였다(도 5의 D). 상기 블롯을 이미지 분석기로 정량한 결과 바이러스 게놈 RNA(도 5의 D, 위 패널)와 18S rRNA(도 5의 D, 아래 패널)의 비율이 의미있는 정도로 다르지는 않았으며, 이러한 사실로부터 모든 경우에 바이러스 게놈 RNA가 유사한 정도로 발현된다는 것을 확인하였다.

<138> 상기의 결과로부터, 감염성이 있는 JEV cDNA(pBAC^{SP6}/JVFL/*Xho*I, pBAC^{SP6}/JVFLx/*Xho*I, pBAC^{SP6}/JVFLx/*Xba*I, 및 pBAC^{SP6}/JVFLx/*Xba*I^{MBN}) 주형으로부터 얻어진 합성 JEV 바이러스는 플라크 형태, cytopathogenicity, 바이러스 성장 패턴, 바이러스 단백질의 합성, 및 바이러스 게놈 RNA의 합성의 관점에서 모 바이러스 CNU/LP2와 구별할 수 없었으며, 상기 결과로부터 본 발명의 감염성이 있는 JEV cDNA 클론을 분자 유전학적 용도로 사용할 수 있음을 확인하였다.

<139> <실시예 7> 모 바이러스(parental virus)의 오염 여부 확인

<140> 상기의 결과들은 JEV cDNA 클론이 SP6 또는 T7 폴리머라제에 의한 전사 후에 높은 감염성을 가진 합성 RNA 전사체를 생산할 수 있다는 것을 강하게 제시하지만, 형질전환된 배양액이 모 바이러스 CNU/LP2에 오염되었을 가능성을 완전히 배제할 수 없다. 따라서, 그러한 가능성을 완전히 배제하기 위하여 본 발명자들은 유전자 마커(genetic marker, gm)를 pBAC^{SP6}/JVFLx/

XbaI 벡터에 도입하기 위하여 PCR을 이용한 위치 지정 돌연변이(site-directed mutagenesis)를 실시하였다. PCR에 의한 위치 지정 돌연변이(site-directed mutagenesis)유도에 의하여 pBAC^{SP6}/JVFLx/*XbaI*에 존재하는 NS5 유전자 내부에 점 돌연변이 A⁸¹⁷¹ → C(silence)를 도입하여 pBAC^{SP6}/JVFLx/gm/*XbaI*을 제조하였다(도 6의 A 참조). 점 돌연변이에 의하여 NS5 유전자 내부에 새로운 *XhoI* 제한효소 인식 부위가 생성된다. 먼저, A⁸¹⁷¹ → C 치환에 의하여 *XhoI* 인식 부위가 생성되는 서열번호 29로 기재되는 프라이머 J48 및 서열번호 30으로 기재되는 프라이머 J3을 사용하여 PCR에 의하여 pBAC^{SP6}/JVFLx/*XbaI* 유래의 절편을 제조하였다. 그 결과 생성된 앰플리콘의 665 bp *MluI*-*ApaI* 절편을 pBAC^{SP6}/JVFLx/*XbaI*의 4,802 bp *ApaI*-*BsrGI* 절편 및 5,874 bp *BsrGI*-*MluI* 절편과 함께 접합시켜 pBAC^{SP6}/JVFLx/gm/*XbaI*을 제조하였다. *XbaI*-선형화되고 MBN-처리된 pBAC^{SP6}/JVFLx/gm/*XbaI*^{MBN}으로부터 합성된 RNA 전사체로 형질전환된 BHK-21 세포는 유전자 마커를 포함하는 감염성이 있는 합성 JEV 바이러스(JVFLx/gm/*XbaI*^{MBN}으로 표기)를 생산하였다(도 6의 A). JVFLx/gm/*XbaI*^{MBN}의 표현형적 특성은 최초의 바이러스 JVFLx/*XbaI*^{MBN}의 경우와 다르지 않았는데, 이것은 A⁸¹⁷¹ → C 치환이 바이러스 자가복제에 영향을 미치지 않았음을 나타낸다.

<141> JVFLx/gm/*XbaI*^{MBN} 바이러스가 pBAC^{SP6}/JVFLx/gm/*XbaI*^{MBN}의 cDNA 주형으로부터 유래된 것임을 증명하기 위하여, 본 발명자들은 BHK-21 세포에서 생산된 바이러스를 0.1 MOI로 순차적으로 계대배양하였다. 각각의 계대배양에서 얻은 바이러스는 입력(input) RNA 전사체와 주형 cDNA 플라스미드의 오염을 피하기 위하여 RNase A 및 DNase I을 각각 처리한 후 계대배양하였다 (Mendez et al.,

J. Virol., 1998, 72, 4737-4745). A⁸¹⁷¹ → C 치환을 포함하는 2,580 bp PCR 산물을 증폭하기 위하여, 1 및 3 계대배양에서 방출된 JVFLx/gm/*Xba*I^{MBN} 및 JVFLx/*Xba*I^{MBN} 바이러스로부터 추출된 바이러스 RNA를 RT-PCR에 사용하였다(도 6의 B, 레인 1, 3 및 5). JVFLx/gm/*Xba*I^{MBN}으로부터 증폭된 RT-PCR 산물을 *Xho*I으로 처리했을 경우 1,506 bp 및 1,074 bp의 두 개의 절편이 생성되었다(도 6의 B, 레인 2 및 4). 반면에, JVFLx/*Xba*I^{MBN} 으로부터 증폭된 RT-PCR 산물은 I 에 의해서 절단되지 않았다(도 6의 B, 레인 5 및 레인 6 비교). 상기 결과는 A⁸¹⁷¹ → C 치환이 실제로 JVFLx/gm/*Xba*I^{MBN} 바이러스 RNA에 존재한다는 것을 의미한다. 따라서, 본 발명자들은 합성된 JVFLx/gm/*Xba*I^{MBN} 바이러스는 전체-길이의 감염성이 있는 JEV cDNA pBAC^{SP6} /JVFLx/gm/*Xba*I^{MBN} 으로부터 유래된 것임을 확인하였다.

<142> <실시예 8> 전체-길이의 감염성이 있는 JEV cDNA의 유전학적 안정성 분석

<143> 이전의 전체-길이의 JEV cDNA를 합성하려는 연구에서는 구조 단백질 prM 및 E를 코딩하는 부위에서 종종 난센스(nonsense) 돌연변이가 발생한다는 것이 보고된 바 있다(Sumiyoshi et al., *J. Virol.*, 1992, 66, 5425-5431). JEV에 대한 분자 생물학적 연구에는 신뢰할 수 있는 감염성이 있는 JEV cDNA 클론이 필수적으로 요구되기 때문에, 본 발명자들은 pBAC^{SP6}/pJVFLx/*Xba*I의 유전학적 안정성에 관해서 심도있게 분석하였다.

<144> 구체적으로, 감염성이 있는 JEV cDNA의 유전자 구조 및 기능을 하기와 같이 분석하였다.

E. coli DH10B 균주를 pBAC^{SP6}/JVFLx/*Xba*I으로 형질전환 시킨 후, 독립적으로 유래된 두 개의 클론을 12.5 µg/ml의 클로람페니콜을 포함하는 10 ml의 2xYT 배양액에 접종한 후 37°C에서 밤새 배양하였다. 상기 일차 배양 세포들을 매일 10⁶배씩 희석시키면서 9일간 유지시켰다 (Almazan et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000, 97, 5516-5521). 본 발명의 실험 조건에서, 각각의 계대배양은 약 20세대를 나타내며, 이것은 이전 보고에서 관찰된 것과 부합된다 (Almazan et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000, 97, 5516-5521). 0번, 3번, 6번 및 9번의 계대배양 후에, SDS-알칼라인(alkaline) 방법에 의하여 큰-규모(large-scale)의 감염성이 있는 cDNA 플라스미드를 DH10B로부터 분리하였고, 세시움 클로라이드 밀도 경사 원심분리 (cesium chloride density gradient centrifugation)로 플라스미드를 정제하였다(Sambrook et al., *Molecular cloning*, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory). 플라스미드 DNA의 유전자 구조를 제한효소 인식 부위 패턴에 의하여 조사하였다. 0번, 3번, 6번 및 9번의 계대배양 후에 분리 정제된 플라스미드를 제한효소 분석으로 플라스미드의 유전자 구조를 조사하였다. 3, 6, 및 9번 계대배양에서의 제한효소 패턴은 0번 계대배양시와 비교하였을 때 시각적으로는 차이가 나지 않았다. 따라서, 아가로스 젤 전기영동 분석의 해상도 범위 내에서, 두 가지 감염성이 있는 cDNA 클론은 구조적으로 안정한 것으로 보인다.

<145> 또한, *Xba*I 절단 및 녹두 뉴클레아제(MBN) 처리에 의하여 선형화된 cDNA 주형으로부터 전사된 합성 RNA 전사체의 특이적 감염성(specific infectivity)을 측정함으로써 계대배양된 JEV cDNA 플라스미드의 유전학적 안정성을 기능적인 측면에서 분석하였다. 그 결과, 두 개의 독립적으로 분리 및 정제된 cDNA로부터 제조된 RNA 전사체의 특이적 감염성은 0번 계대배양과 9번 계대배양사이에서 큰 차이를 보이지 않았다(

도 7). 상기 결과로부터, 감염성이 있는 JEV cDNA는 *E. coli*에서의 계대배양 과정에서 구조적 및 기능적으로 안정하게 유지되고 있음을 확인하였다.

<146> <실시예 9> 감염성이 있는 JEV cDNA를 이형 유전자의 발현을 위한 벡터로의 응용

<147> 이전에 보고된 바와 같이(Burke and Monath, *Flaviviruses*, 2001, 1043-1125, Lippincott Williams&Wilkins Publishers), 본 발명자들은 JEV는 인간, 마우스, 원숭이, 돼지, 개, 고양이 및 햄스터를 포함하는 다양한 종류의 세포에서 자가복제될 수 있음을 발견하였다. 상기 결과는 JEV가 다양한 종류의 세포에서 이형 유전자의 발현을 위한 벡터로 유용하게 사용될 수 있음을 의미한다. 이를 테스트하기 위하여, pBAC^{SP6}/JVFLx/*Xba*I상의 바이러스 3' NTR 시작 부위에 일반적으로 사용되는 리포터 유전자인 *Aequorea victoria* GFP(green fluorescent protein) 및 *Photinus pyralis* LUC(luciferase)을 EMCV IRES(internal ribosome entry site of encephalomyocarditis virus) element와 함께 삽입시켰다(도 8의 A 참조).

<148> 이를 위하여, 먼저 pBAC^{SP6}/JVFLx/GFP/*Xba*I(도 8의 A 참조)을 제조하기 위하여, pBAC^{SP6}/JVFLx/*Xba*I 유래의 절편을 서열번호 31로 기재되는 프라이머 J72 및 서열번호 32로 기재되는 프라이머 J73을 사용한 PCR에 의하여 증폭시켰다. 또한, 서열번호 33으로 기재되는 프라이머 J74 및 서열번호 34로 기재되는 프라이머 J75를 사용하여 pRSGFP-C1의 절편을 증폭하였다. J72 및 J75 프라이머를 사용한 PCR에 의하여 상기 두 가지 절편을 융합시켰다. 그 결과 생성된 앰플리콘의 913 bp *Kpn*I-*Nsi*I 절편을 pBAC^{SP6}/JVFLx/*Xba*I의 8,011 bp *Nsi*I-*Pac*I 및 11,021 bp *Pac*I-*Kpn*I 절편에 접합시켜 pBAC^{SP6}/JVFLx/GFP/*Xba*I을 제조하였다.

- <149> 다음으로, pBAC^{SP6}/JVFLx/LUC/*Xba*I(도 8의 A 참조)을 제조하기 위하여, pBAC^{SP6}/JVFLx/*Xba*I 유래의 절편을 프라이머 J72 및 서열번호 35로 기재되는 프라이머 J76을 사용한 PCR에 의하여 증폭시켰다. 또한, 서열번호 36으로 기재되는 프라이머 J77 및 서열번호 37로 기재되는 프라이머 J78을 사용하여 pACNR/NADLcIn⁻/LUC(Charles M. Rice로부터 받음)의 절편을 증폭하였다. J72 및 J78 프라이머를 사용한 PCR에 의하여 상기 두 가지 절편을 융합시켰다. 그 결과 생성된 앰플리콘의 1,801 bp *Kpn*I-*Nsi*I 절편을 pBAC^{SP6}/JVFLx/*Xba*I의 8,011 bp *Nsi*I-*Pac*I 및 11,021 bp *Pac*I-*Kpn*I 절편에 접합시켜 pBAC^{SP6}/JVFLx/LUC/*Xba*I을 제조하였다.
- <150> NS3 유전자의 가운데 부분에 83개의 5,580-5,663 뉴클레오타이드가 결실되어 5,596 뉴클레오타이드에서 바이러스 번역이 조기종결(pretermination)되는 pBAC^{SP6}/JVFLx/LUC^{REP-}/*Xba*I 벡터(도 8의 A 참조)를 제조하기 위하여, pBAC^{SP6}/JVFLx/LUC/*Xba*I 절편을 서열번호 38로 기재되는 프라이머 J90 및 서열번호 39로 기재되는 프라이머 J91을 사용하여 PCR에 의하여 증폭시켰다. 또한, 서열번호 40으로 기재되는 프라이머 J92 및 서열번호 41로 기재되는 프라이머 J93을 사용하여 pBAC^{SP6}/JVFLx/LUC/*Xba*I의 절편을 증폭하였다. J90 및 J93 프라이머를 사용한 PCR에 의하여 상기 두 가지 절편을 융합시켰다. 그 결과 생성된 앰플리콘의 3,960 bp *Sfi*I-*Eag*I 절편을 pBAC^{SP6}/JVFLx/LUC/*Xba*I의 6,493 bp *Eag*I-*Sfi*I 및 10,297 bp *Sfi*I-*Sfi*I 절편에 접합시켜 pBAC^{SP6}/JVFLx/LUC^{REP-}/*Xba*I을 제조하였다.
- <151> CNU/LP2 뿐만 아니라 전체 서열이 밝혀진 세 개의 JEV 바이러스주(Williams et al., *J. Gen. Virol.*, 2000, 81, 2471-2480; Nam et al., *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 2001, 65, 388-392; Jan et al., *Am. J. Troop. Med. Hyg.*, 1996, 55, 603-609)에서, 9-25 bp의 작은 결실이 바이러스 3'NTR 시작부위에서 관찰되었는데, 이것은 상기 부위가 이형 유전자를 삽입시키기 위한 좋은 부위가 될 수 있음을 제시한다. 따라서, 상기와 같이 합성된 pBAC^{SP6}/JVFLx/GFP/*Xba*I와

pBAC^{SP6}/JVFLx/LUC/*Xba*I cDNA를 주형으로해서 만들어진 합성 RNA 전사체를 BHK-21 세포에 형질 전환시켰을 때, 이형 유전자의 삽입으로 인해서 합성 RNA 전사체의 특이적 감염성이 변화하지는 않았다.

<152> GFP 발현을 조사하기 위하여, pBAC^{SP6}/JVFLx/GFP/*Xba*I^{MBN} cDNA 주형에서 전사된 감염성이 있는 합성 RNA 전사체를 순수한(naive) BHK-21 세포에 형질전환시킨 후, 동초점 현미경으로 조사하였다. 구체적으로, BHK-21 세포를 mock-형질전환 (mock-transfection)시키거나 또는 2 μ g의 JVFLx/GFP/*Xba*I^{MBN} RNA를 사용하여 형질전환시켰다. 1×10^5 의 형질전환된 세포를 4-웰 챔버 슬라이드에서 30시간 동안 배양시켰다. PBS를 사용하여 세포를 두차례 세척한 후 0.37%(v/v) 포르말데하이드(formaldehyde)가 첨가된 PBS에 25℃에서 30분간 배양시켜 고정하였고, 0.2 ml의 80% 글리세롤로 마운팅을 실시하였다. 마운팅된 세포는 동초점 현미경으로 관찰하였다. 그 결과, GFP는 핵과 세포질 사이에 확산될 수 있을 정도로 충분히 작기 때문에(약 30 kDa), GFP를 발현하는 세포는 핵과 세포질 모두에서 초록색 형광이 나타났다(도 8의 B, JVFLx/GFP/*Xba*I^{MBN}). 예상된 바와 같이, 이러한 형광은 mock-형질전환된 세포뿐만 아니라 pBAC^{SP6}/JVFLx/*Xba*I^{MBN} 유래의 RNA 전사체로 형질전환된 세포에서는 관찰이 되지 않았다(도 8의 B, Mock).

<153> 시간에 따른 LUC의 유도 (induction)를 정량적으로 분석하기 위하여, 본 발명자들은 pBAC^{SP6}/JVFLx/LUC/

*Xba*I^{MBN} 유래의 복제-수용성(replication-competent) RNA 전사체 뿐만 아니라, pBAC^{SP6}/*JVFLx*/*LUC*^{REP-}/*Xba*I^{MBN} 유래의 복제-비수용성(replication-incompetent) RNA 전사체도 제조하였다(도 8의 A). pBAC^{SP6}/*JVFLx*/*LUC*^{REP-}/*Xba*I^{MBN} 주형은 NS3 유전자의 가운데 부위인 뉴클레오타이드 5,581-5,663에 83개 뉴클레오타이드가 결실되어있다. 따라서 뉴클레오타이드 5,596에서 바이러스의 번역이 미리종결(pretermination) 됨으로 바이러스 RNA의 자가복제가 일어나지 않는다(도 8의 A의 * 참조, pBAC^{SP6}/*JVFLx*/*LUC*^{REP-}/*Xba*I^{MBN}).

<154> pBAC^{SP6}/*JVFLx*/*LUC*/*Xba*I^{MBN}상의 바이러스 cDNA에 엔지니어링된 LUC 유전자로부터 발현되는 루시페라제 양을 분석하기 위해서, 8×10^6 의 BHK-21 세포를 mock-형질전환(mock-transfection)시키거나, 2 μ g의 *JVFLx*/*LUC*/*Xba*I^{MBN} RNA 또는 *JVFLx*/*LUC*^{REP-}/*Xba*I^{MBN} RNA로 형질전환시켰다. 6×10^5 세포/웰의 농도로 세포를 6-웰 플레이트에 분주한 후 배양하였다. 정해진 시점에서, Ca²⁺ 및 Mg²⁺가 제거된 PBS 용액으로 세포를 세척한 후 0.2 ml의 용해 버퍼[25 mM Tris-phosphate pH 7.8, 2 mM DTT, 2 mM 1,2-diaminocyclohexane-N,N,N',N'-tetraacetic acid, 10% glycerol, 1% Triton X-100(v/v)]를 각각의 웰에 첨가시켜 세포를 용해시켰다. 세포 용해물(lysate)을 실온에서 10분간 배양시킨 후, 세포 침전물(debris)을 원심분리로 제거하였다. 상등액을 신속하게 -80°C에 보관하였다. 루시페라제 활성을 측정하기 위하여, 20 μ l의 세포 용해물을 100 μ l의 루시페라제 분석 시약[20 mM Tricine, 1.07 mM(MgCO₃)₄Mg(OH)₂·5H₂O, 2.67 mM MgSO₄, 0.1 mM EDTA, 33.3 mM DTT, 270 μ M coenzyme A, 470 μ M luciferin(Promega), 530 μ M ATP]이 포함되어 있는 발광측정기(luminometer) 튜브에 위치시켰다(placed). 루시페라제 활성은 10 초간 측정하였다. 각각의 데이터는 세 번의 독립적인 실험의 결과를 나타낸다.

<155> 그 결과, 복제-수용성 JVFLx/LUC/*XbaI*^{MBN} RNA로 형질전환된 BHK-21 세포에서는(도 8의 C, 검은 원), 형질전환후 6시간에 최초 루시페라제 활성이 $2.4 \pm 0.2 \times 10^3$ RLU(relative light units) 이었다. 이러한 활성은 형질전환후 30시간에 $5.3 \pm 0.1 \times 10^4$ RLU로 극적으로 증가되었으며, 형질전환후 54시간에는 $7.8 \pm 0.1 \times 10^5$ RLU에 이르렀고, 이 시점에서 >50%의 세포가 죽었다. 반면에, 복제-비수용성 JVFLx/LUC^{REP-}/*XbaI*^{MBN} RNA로 형질전환된 BHK-21 세포에서는, 형질전환후 6시간에 최초 루시페라제 활성이 $1.9 \pm 0.4 \times 10^3$ RLU로서(도 8의 C, 흰 원) JVFLx/LUC/*XbaI*^{MBN}-로 형질전환된 세포의 경우와 유사하였으나(도 8의 C, 검은 원 참조), 시간이 경과함에 따라 활성이 점진적으로 감소하여 형질전환후 54시간에는 16 ± 2 RLU로 감소하였다. 이러한 수치는 순수한(naive) 세포의 배경(background) 루시페라제 활성 수준이다(도 8의 C, 흰 원). 따라서, 시간에 따라 발현되는 루시페라제 활성의 정도는 바이러스 복제의 유무에 따라 다르게 나타난다.

<156> 또한, 본 발명자들은 상기에서 기술한 것과 같이 GFP와 LUC 유전자를 가진 전체-길이의 감염성이 있는 JEV cDNA로부터 합성한 JEV RNA 전사체를 BHK-21 세포내에 형질전환시킨 후, 배양상등액으로부터 GFP와 LUC 유전자를 포함한 재조합된 JVFLx/GFP/*XbaI*^{MBN} 및 JVFLx/LUC/*XbaI*^{MBN} JEV 바이러스를 제조하였다. 이렇게 생산된 재조합 JEV 바이러스(recombinant JEV)로부터 GFP와 LUC 유전자의 발현여부는 일반적으로 생명과학 및 의학분야에서 많이 사용되는 다양한 동물 세포주(BHK-21, Vero, NIH-3T3, ST, HeLa, MDCK, CRFK, B103, 및 SHSY-5Y)에 감염시킴으로써 관찰하였다. 그 결과, 바이러스 게놈 RNA에 삽입된 GFP 또는 LUC 유전자는 분석한 모든 종류의 세포에서 발현됨을 관찰할 수 있었다(표 4). 따라서, 재조합된 JEV cDNA, JEV RNA 전사체, 및 JEV 바이러스는 다양한 종류의 세포내에서 외래 이형 유전자의 발현을 위한 벡터로써 유용하게 사용될 수 있음을 확인하였다.

157> 【표 4】

감염성이 있는 JEV cDNA상에 엔지니어링된 GFP 및 LUC 유전자의 발현

감염에 사용된 세포주	GFP의 발현 ^a	LUC의 유도 ^b
BHK-21	발현됨	발현됨
Vero	발현됨	발현됨
HeLa	발현됨	발현됨
MDCK	발현됨	발현됨
CRFK	발현됨	발현됨
NIH-3T3	발현됨	발현됨
ST	발현됨	발현됨
B103	발현됨	발현됨
SHSY-5Y	발현됨	발현됨

<158> a : 재조합된 JEV 바이러스 JVFLx/GFP/*Xba*I^{MBN}으로 감염 후 GFP의 발현을 분석

<159> b : 재조합된 JEV 바이러스 JVFLx/LUC/*Xba*I^{MBN}으로 감염 후 LUC의 발현을 분석

【발명의 효과】

<160> 상기에서 살펴본 바와 같이, 본 발명의 JEV 계놈 RNA의 완전한 뉴클레오타이드 염기서열 분석 및 이로부터 합성한 전체-길이의 감염성이 있는 JEV cDNA는 첫째 신경침입성(neurovirulence) 및 병원성(pathogenesis)에 관여하는 JEV 유전자를 동정하는 것뿐만 아니라, 둘째 JEV의 자가복제(replication), 전사(transcription), 및 번역(translation)에 관련된 분자생물학적인 메카니즘의 연구에 사용될 수 있으며, 셋째 포유동물세포를 포함한 다양한 종류의 세포들에서 이형 유전자의 발현을 위해서 필요한 새로운 유전자 발현벡터(gene expression vector)로 사용될 수 있으며, 마지막으로 상기 cDNA로부터 만들어진 여러 형태의 치료제, 치료용백신과 예방용백신, 진단시약, 및 진단용 기구등의 개발에도 유용하게 사용될 수 있다.

【특허청구범위】**【청구항 1】**

5'-비번역 부위, 일본뇌염바이러스(Japanese encephalitis virus; JEV) 폴리펩타이드 코딩 부위, 및 3'-비번역 부위로 구성되는 한국형 JEV 게놈 RNA.

【청구항 2】

제 1항에 있어서, 게놈 RNA의 전체 길이는 10,968 bp이며, 95 bp로 이루어진 5'-비번역 부위, 10,299 bp로 이루어진 폴리펩타이드 코딩 부위, 및 574 bp로 이루어진 3'-비번역 부위로 구성되는 것을 특징으로 하는 한국형 JEV 게놈 RNA.

【청구항 3】

제 1항에 있어서, 서열번호 15로 기재되는 것을 특징으로 하는 한국형 JEV 게놈 RNA.

【청구항 4】

제 3항에 있어서, 서열번호 15로 기재되는 JEV 게놈 RNA와 98% 이상의 상동성이 있는 것을 특징으로 하는 JEV 게놈 RNA.

【청구항 5】

제 1항에 있어서, 5'-말단부위 염기서열은 ¹AGAAGT-인 것을 특징으로 하는 JEV 게놈 RNA.

【청구항 6】

제 1항에 있어서, 3'-말단부위 염기서열은 -GATCT¹⁰⁹⁶⁸ 인 것을 특징으로 하는 JEV 게놈 RNA.

【청구항 7】

제 1항의 전체-길이의 JEV 게놈 RNA에 대한 감염성이 있는 JEV cDNA.

【청구항 8】

제 7항에 있어서, 상기 cDNA는 JEV 게놈 RNA의 5'-말단 앞에 프로모터를 포함하고, JEV 게놈 RNA의 3'-말단 바로 뒤에 런-오프 자리로써 제한효소 인식 염기서열 부위를 포함하는 것을 특징으로 하는 JEV cDNA.

【청구항 9】

제 8항에 있어서, 상기 프로모터는 SP6 또는 T7 프로모터인 것을 특징으로 하는 JEV cDNA.

【청구항 10】

제 8항에 있어서, 상기 제한효소 인식 염기서열 부위는 JEV 바이러스 게놈 RNA에 존재하지 않는 염기서열인 것을 특징으로 하는 JEV cDNA.

【청구항 11】

제 8항에 있어서, 상기 제한효소 인식 염기서열 부위는 *Xho*I 또는 *Xba*I인 것을 특징으로 하는 JEV cDNA.

【청구항 12】

제 8항에 있어서, SP6 프로모터를 가지며 서열번호 43, 서열번호 44, 및 서열번호 45로 기재되는 염기서열과 T7 프로모터를 가지며 서열번호 46, 서열번호 47, 및 서열번호 48로 기재되는 염기서열로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 JEV cDNA.

【청구항 13】

제 7항의 전체-길이의 JEV 게놈 RNA에 대한 cDNA를 포함하는 벡터.

【청구항 14】

제 13항에 있어서, BAC(bacterial artificial chromosome)을 모벡터로 사용하는 것을 특징으로 하는 벡터.

【청구항 15】

제 13항에 있어서, 상기 벡터는 SP6 프로모터를 가지며 서열번호 43, 서열번호 44, 및 서열번호 45로 기재되는 JEV cDNA를 포함하는 pBAC^{SP6}/JVFL/*Xho*I, pBAC^{SP6}/JVFLx/*Xho*I, pBAC^{SP6}/JVFLx/*Xba*I 및 T7 프로모터를 가지며 서열번호 46, 서열번호 47, 및 서열번호 48로 기재되는 JEV cDNA를 포함하는 pBAC^{T7}/JVFL/*Xho*I, pBAC^{T7}/JVFLx/*Xho*I, pBAC^{T7}/JVFLx/*Xba*I으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 벡터.

【청구항 16】

제 15항에 있어서, 상기 벡터는 T7 프로모터를 가지는 pBAC^{T7}/JVFLx/*Xba*I인 것을 특징으로 하는 벡터(수탁번호 ; KCTC 10346BP).

【청구항 17】

제 15항에 있어서, 상기 벡터는 SP6 프로모터를 가지는 pBAC^{SP6}/JVFLx/*Xba*I인 것을 특징으로 하는 벡터(수탁번호 ; KCTC 10347BP).

【청구항 18】

제 13항의 벡터로부터 합성된 감염성이 있는 JEV RNA 전사체.

【청구항 19】

제 18항에 있어서, 3'-말단에 바이러스와 연관되지 아니하는 뉴클레오타이드를 제거한 것을 특징으로 하는 감염성이 있는 JEV RNA 전사체.

【청구항 20】

제 19항에 있어서, 녹두 뉴클레아제로 처리함으로써 바이러스와 연관되지 아니하는 뉴클레오타이드를 제거한 것을 특징으로 하는 감염성이 있는 JEV RNA 전사체.

【청구항 21】

제 18항의 JEV RNA 전사체로 형질전환된 형질전환체.

【청구항 22】

제 21항의 형질전환체를 배양하여 얻어지는 합성된 JEV 바이러스(synthetic JEV).

【청구항 23】

제 22항에 있어서, JEV cDNA 상에 돌연변이를 도입함으로써 돌연변이를 갖는 것을 특징으로 하는 합성된 JEV 바이러스.

【청구항 24】

- 1) 제 13항의 JEV cDNA 벡터에 이형 유전자를 삽입시켜 재조합된 JEV cDNA 발현 벡터를 제조하는 단계;
- 2) 상기 재조합된 JEV cDNA 발현벡터로부터 JEV RNA 전사체를 제조하는 단계;
- 3) 상기 JEV RNA 전사체를 숙주세포에 형질전환시켜 형질전환체를 제조하는 단계;
- 4) 형질전환체를 배양하여 외래 단백질을 발현시키는 단계로 구성되는 JEV cDNA를 이용하여 이형 유전자를 발현시키는 방법.

【청구항 25】

제 24항에 있어서, 외래 단백질의 유전자를 JEV 전체-길이의 감염성이 있는 cDNA상의 JEV 3'NTR 시작부위에 삽입하여 제조하는 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 26】

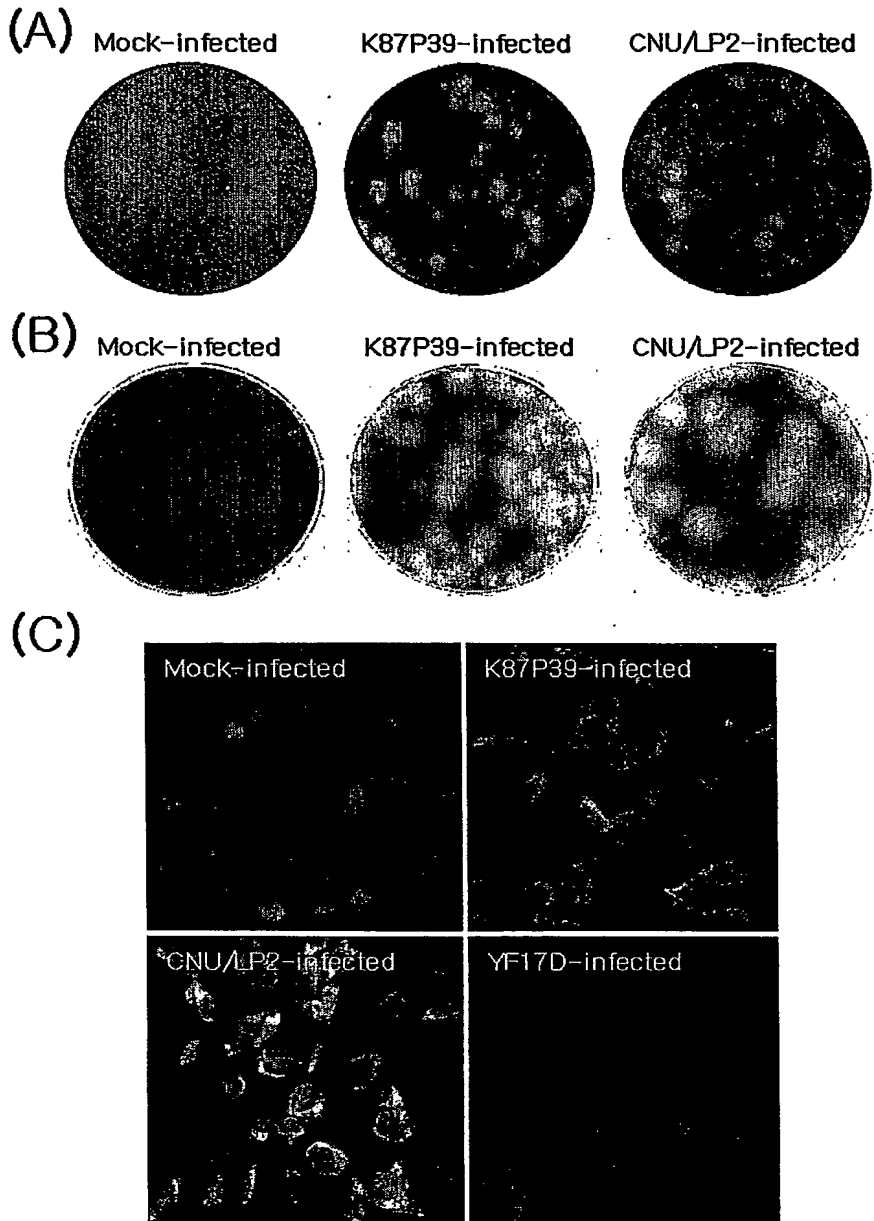
JEV 게놈 RNA 또는 JEV cDNA로부터 유래된 요소를 포함하는 JEV에 대한 진단 시약.

【청구항 27】

JEV 게놈 RNA 또는 JEV cDNA로부터 유래된 요소를 포함하는 항-JEV 바이러스 백신.

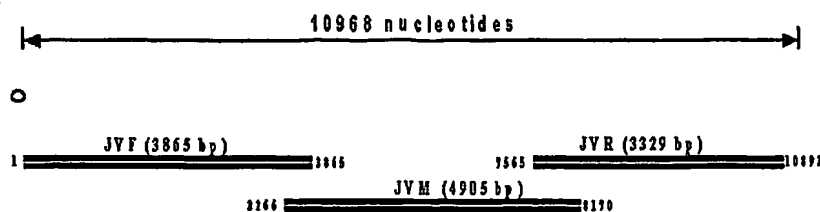
【도면】

【도 1】

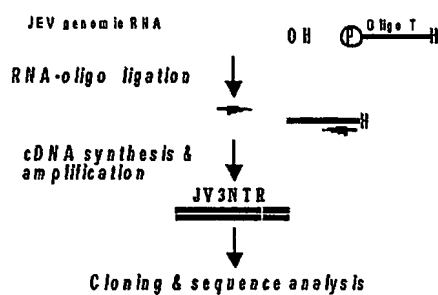


【도 2】

(A)



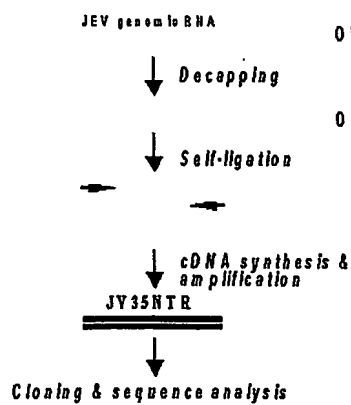
(B)



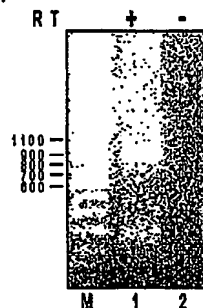
(C)



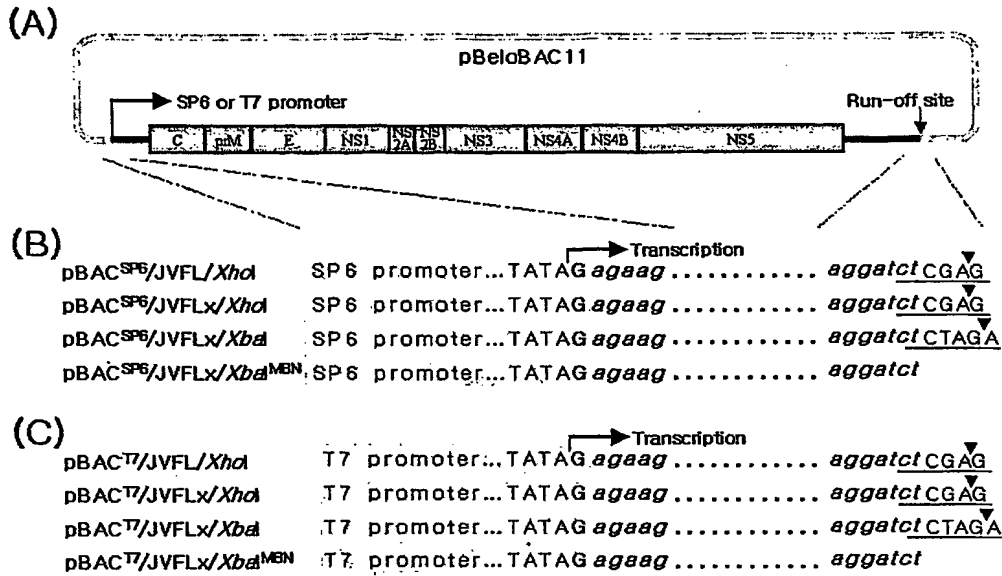
(D)



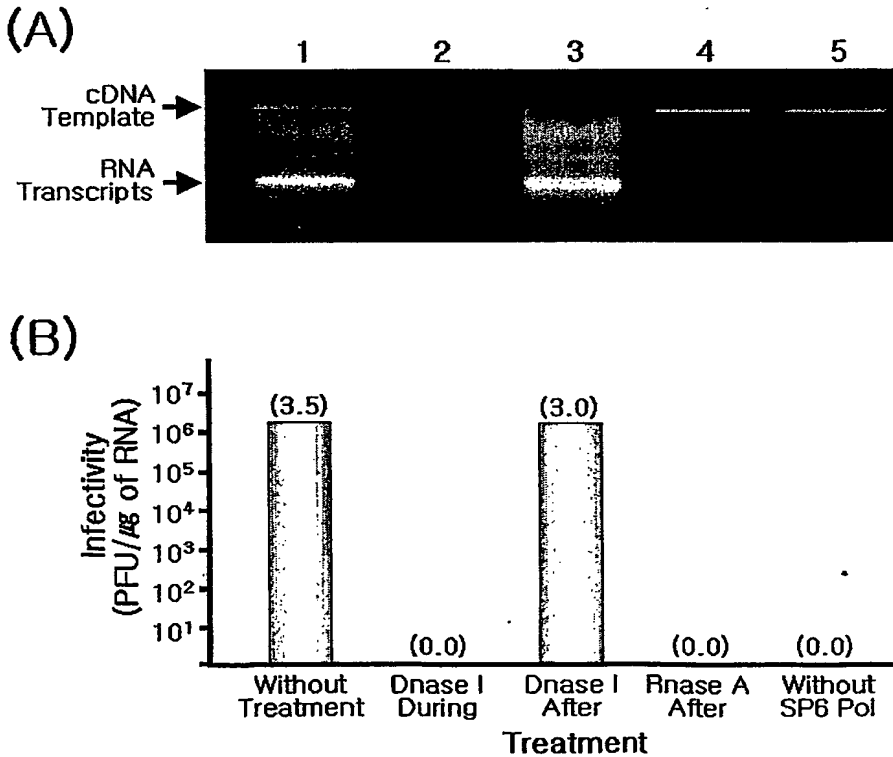
(E)



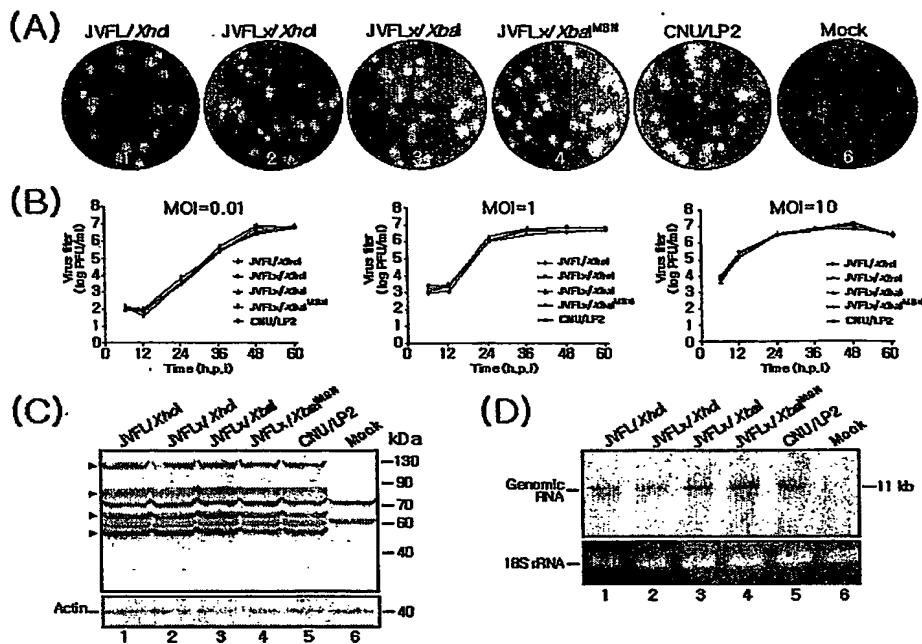
【도 3】



【도 4】

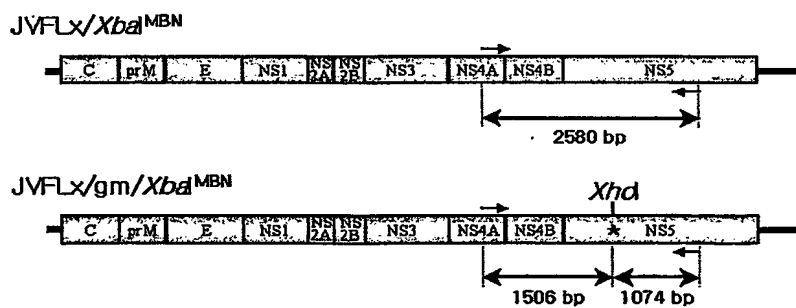


【도 5】

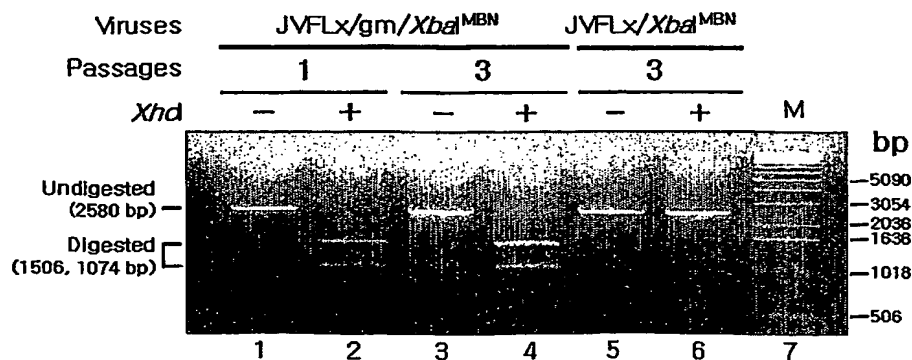


【도 6】

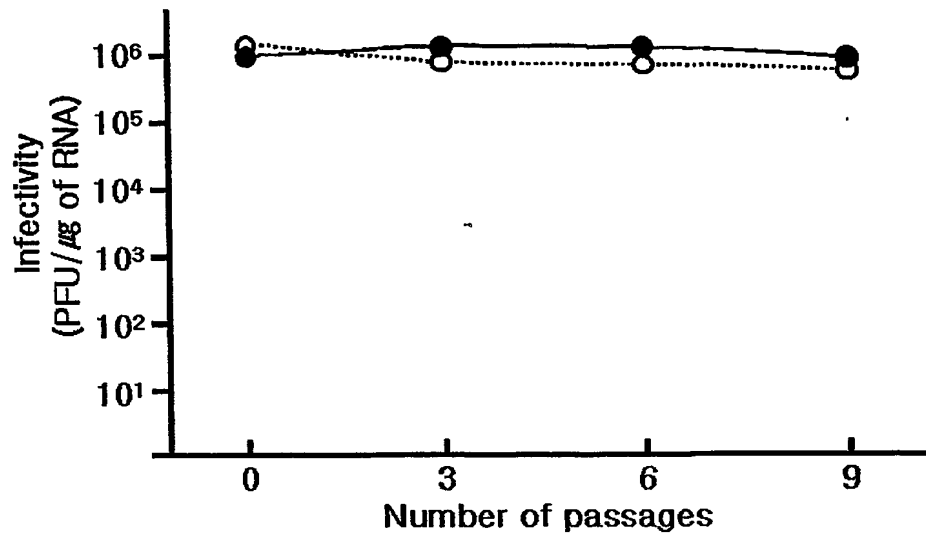
(A)



(B)

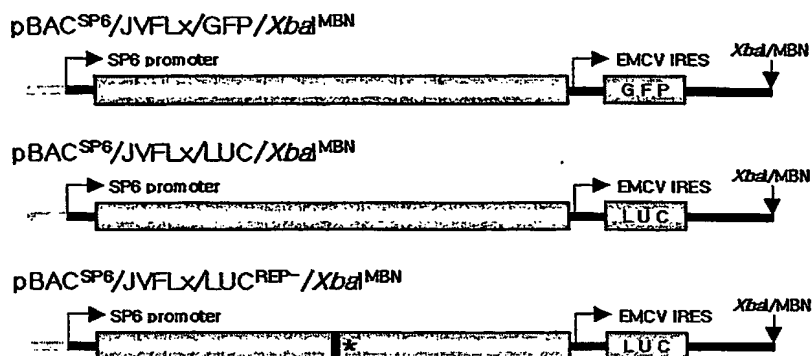


【도 7】

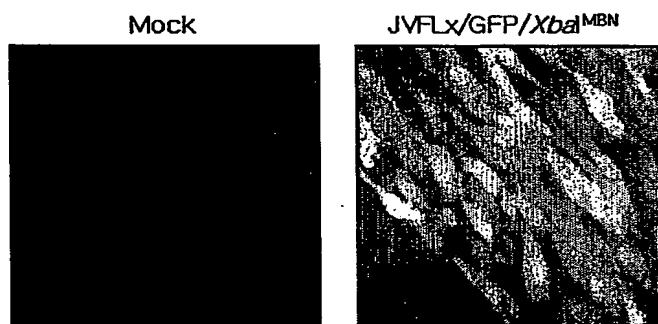


【도 8】

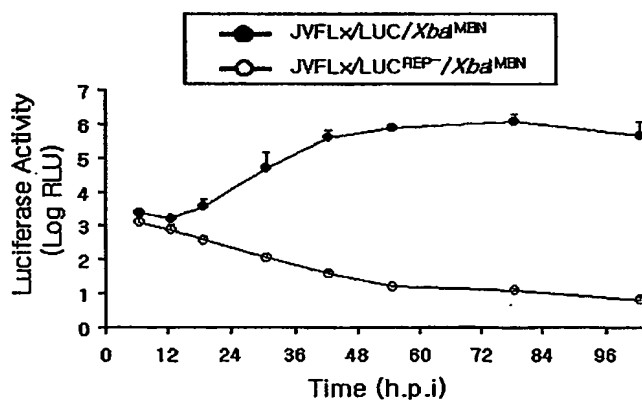
(A)



(B)



(C)



【서열목록】

<110> LEE, Young-Min <120> Novel full-length genomic RNA for Japanese
encephalitis virus and infectious JEV cDNA therefrom <130> 2p-07-10B

<160> 48 <170> KopatentIn 1.71 <210> 1 <211> 18 <212> DNA <213>

Artificial Sequence <220> <223> primer J7, complementary to nt 3986-4003 of the
JEV genome <400> 1 agcgctaaga ctggcatg

18 <210> 2 <211> 28 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
primer J8, complementary to nt 1-18 of the JEV genome <400> 2 gatcggaccg
agaagtttat ctgtgtga 28 <210> 3 <211>

21 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> primer J6, complementary
to nt 3845-3865 of the JEV genome <400> 3 gccccctagga ccagaaccac g

21 <210> 4 <211> 21 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
primer J4, complementary to nt 8150-8170 of the JEV genome <400> 4 aggacgcgta
gtgtgcgttg t 21 <210> 5 <211>

18 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> primer J20, complementar
to nt 3266-3283 of the JEV genome <400> 5 aaaccaggga ccttgga

18 <210> 6 <211> 21 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
primer J1, complementary to nt 10947-10967 of the JEV genome <400> 6 gatcctgtgt
tcttcctcac c 21 <210> 7 <211>

27 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> primer J12, complementar
to nt 7565-7582 of the JEV genome <400> 7 gatcggaccg aattccacca cagccac

27 <210> 8 <211> 24 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
primer J2, complementary to nt 10870-10893 of the JEV genome <400> 8 agaagatctc
ccagtctatt ccca 24 <210> 9 <211>

10818 <212> DNA <213> Japanese encephalitis virus <400> 9 agagattagt

gcagtttaaa cagtttttta gaacggaaga taaccatgac taaaaaacca	60 ggagggcccg
gtaaaaaccg ggctatcaat atgctgaaac gcggcctacc ccgcgtattc	120 ccactagtgg
gagtgaagag ggtagtaatg agcttggttg acggcagagg accagtacgt	180 ttcgtgctgg
ctcttatcac gtctttcaag ttacagcat tagccccgac caaggcgctt	240 ttaggccgat
ggaaagcagt ggaaaagagt gtggcaatga aacatcttac tagtttcaaa	300 cgagaacttg
gaacactcat tgacgccgtg aacaagcggg gcagaaagca aaacaaaaga	360 ggaggaaatg
aaggctcaat catgtggctc gcgagtttgg cagttgtcat agcttgtgta	420 ggagccatga
agttgtcaaa ttccaaggg aagcttttga tgaccattaa caacacggac	480 attgcagacg
tcacgtgat tcctacctca aaaggagaga acagatgctg ggtccgggca	540 atcgatgtcg
gctacatgtg tgaggacact atcacgtacg aatgtcctaa gcttaccatg	600 ggcaatgatc
cagaggatgt ggattgctgg tgtgacaacc aagaagtcta cgtccaatat	660 ggacggtgca
cgcggaccag gcattccaag cgaagcagga ggtccgtgtc ggtccaaaca	720 catggggaga
gttactagt gaataaaaaa gaggcttggc tggattcaac gaaagccaca	780 cgatatctca
tgaaaactga gaactggatc ataaggaatc ctggctatgc ttctctggcg	840 gcggtacttg
gctggatgct tggcagtaac aatggtcaac gcgtggtgtt taccatctc	900 ctgctgttgg
tcgtccggc ttacagtttt aattgtctgg gaatgggcaa ccgtgacttc	960 atagaaggag
ccagtggagc cacttgggtg gacttagtgc tagaaggaga tagctgcttg	1020 acaatcatgg
caaacgacaa accaacattg gacgtccgca tgattaacat cgaagccagc	1080 caacttgctg
aggtcagaag ctattgctat catgcttcag tcaactgacat ctgcacggtg	1140 gtcggtgcc
ccacgactgg agaagccac aacgagaagc gagctgatag tagctatgtg	1200 tgcaaacaag
gtttcactga tcgtgggtgg ggcaacggat gtggactttt cggaaggga	1260 agcattgaca

catgtgcaaa attctcctgc accagtaagg cgattgggag aacaatccag	1320 ccagaaaaca
tcaaatacga agttggcatt tttgtgcatg gaaccaccac ctcggaaaac	1380 catgggaatt
attcagcgca agtaggggcg tcccaggcgg caaagtittac agtaacaccc	1440 aatgctcctt
cgataaccct caaacttggg gactacggag aagtcacact ggactgtgaa	1500 ccaaggagtg
gactgaacac tgaagcgttt tacgtcatga ccgtgggggtc aaagtcattt	1560 ctggtccata
gggaatgggt tcatgacctc gctctcccct ggacgtcccc ttcgagcaca	1620 gcgtggagaa
acagagaact cctcatggaa tttgaagagg cgcacgccac aaaacagtcc	1680 gttgttgctc
ttgggtcaca ggaaggaggc ctccatcagg cgctggcagg agccatcgtg	1740 gtggagtact
caagctcagt gaagttaaca tcaggccacc tgaaatgtag gctgaaaatg	1800 gacaaactgg
ctctgaaagg cacaacctat ggcatgtgta cagaaaaatt ctcgttcgcg	1860 aaaaatccgg
cggacactgg ccacggaaca gttgtcattg aactctccta ttctgggagt	1920 gatggcccct
gcaaaattcc gattgtctcc gttgcgagcc tcaatgacat gacccccgtt	1980 gggcggctgg
tgacagtga ccccttcgtc gcgacttcca gtgccaactc aaaggtgctg	2040 gtcgagatgg
aacccccctt cggagactcc tacatcgtag ttggaagggg agacaagcag	2100 atcaaccacc
attggcataa agctggaagc acgtgggca aggcTTTTTc aacaactttg	2160 aaggagctc
aaagactggc agcgttgggc gacacagcct gggacttttg ctctattgga	2220 ggggtcttca
actccatagg aaaggccgtt caccaagtgt ttggtggcgc tttcagaaca	2280 ctctttgggg
gaatgtcttg gatcacacaa gggttaatgg gtgccctact actctggatg	2340 ggcatcaacg
cacgagatcg atcaattgct ttggccttct tggccacagg aggtgtgctc	2400 gtgttcttag
cgaccaatgt gcatgctgac actggatgtg ccattgacat cgcaagaaaa	2460 gagatgagat
gcggaagtgg catcttcgtg cacaacgacg tggaagcctg ggtggatagg	2520 tataaatatt

tgccagaaac gccagatcc ctagcgaaga tcgtccacaa agcgcacaaag	2580 gaaggcgtgt
gcggagtcag atctgtcact agactggagc accaaatgtg ggaagccgtg	2640 cgggacgaat
tgaacgtcct gctcaaagag aatgcagtgg acctcagtgt ggttgtgaac	2700 aagcccgtgg
ggagatatcg ctacagcccca aaacgcctgt ccatgacgca agagaagttt	2760 gaaatgggct
ggaaagcatg gggaaaaagc attctctttg ccccggaatt ggctaactcc	2820 acatttgttg
tagatggacc tgagacaaag gaatgtcctg atgagcacag agcctggaac	2880 agcatgcaaa
tcgaagactt cggcttttgt atcacatcaa cccgtgtgtg gctgaagatt	2940 agagaggaaa
gcactgacga gtgtgatgga gcgatcatag gcacagctgt caaaggacat	3000 gtggcagttc
atagtgactt gtcgtactgg attgagagtc gctacaacga cacatggaaa	3060 cttgagaggg
cagtcttttg agaggtaaaa tcttgcactt ggccagagac acacactctt	3120 tggggagatg
gtgttgagga aagtgaactc atcatccgc ataccatagc cggacaaaaa	3180 agcaagcaca
atcggaggga agggtaaaa acacaaaacc agggaccttg ggacgaaaac	3240 ggcatagtct
tggactttga ttattgccca gggacaaaag tcacatcac agaggattgt	3300 ggcaagagag
gcccttcggt cagaaccact actgacagtg gaaagttgat tactgactgg	3360 tgctgtcgca
gttgctccct tccgccccta cgattccgga cagaaaatgg ctgctggtac	3420 ggaatggaaa
tcagacctgt taggcatgat gaaacaacac tcgtcagatc acaggttgat	3480 gctttcaatg
gtgaaatggg tgaccctttt cagctgggcc ttctggtgat gtttctggcc	3540 acccaggagg
tccttcgcaa gaggtggacg gccagattga ccattcctgc ggttttgggg	3600 gccctgcttg
tgctgatgct tgggggcac accttacctg atttggcgag gtatgtggtg	3660 ctagtcgctg
ctgctttcgc agaggccaat aatggaggag acgtcctgca ccttgctttg	3720 attgccgttt
ttaagatcca accagctttt ctagtgatga acatgcttag cacgagatgg	3780 acgaaccaag

aaaacgtggt cctggtccta ggggctgcct tctttcaatt ggcctcagta	3840 gatctgcaaa
tcggaagtcca cggaatcctg aatgccgccg ctatagcatg gatgattgtt	3900 cgagcgatca
ccttccccac aacctcctcc gtcacatgc cagtcttagc gcttctaact	3960 ccgggaatga
gggctctata cctagacact tacagaatca tccttctcgt catagggatt	4020 tgctccctgc
tgcaagagag gaaaaagacc atggcaaaaa agaaaggagc tgtactcttg	4080 ggcttagcgc
tcacatccac tggatggttc tcgccacca ccatagctgc tggacttatg	4140 gtctgcaacc
caaacaagaa gagagggtgg ccagctactg agtttctgtc ggcagtcgga	4200 ttgatgtttg
ccatcgtagg tggtttggcc gagttggata ttgaatccat gtcaataccc	4260 ttcatgctgg
caggtcttat ggcagtgtcc tacgtagtgt caggaaaagc aacagatatg	4320 tggctcgaac
gggccgccga catcagctgg gagatggatg ctgcaatcac aggaagcagt	4380 cggaggctgg
atgtgaaact ggatgatgac ggagattttc acttgattga tgatcccggc	4440 gttccatgga
aagtttgggt cttgcgcatg tcttgcatg gcttagccgc cctcacgcct	4500 tgggccattg
ttcccgccgc tttcggttac tggctcactt taaaaacaac aaaaagaggg	4560 ggcgtgtttt
gggacacgcc atccccgaaa ccttgcttaa aaggagacac cactacagga	4620 gtctaccgaa
tcatggctag agggattctt ggcacctacc aggctggcgt cggagtcatg	4680 tacgagaatg
tttccacac actatggcac acaactagag gggcagccat tatgagtgga	4740 gaaggaaaat
tgacgccata ctggggtagc gtgaaagaag accgcatagc ttacggaggc	4800 ccatggagat
ttgatcgaat atggaatgga acagatgacg tgcaagtgat cgtggtagaa	4860 ccggggaagg
ctgcggtaaa catccagaca aaaccaggag tgtttcggac ccccttcggg	4920 gaggttgggg
ctgttagcct ggattaccg cgaggaacat ccggctcacc cattctggat	4980 tccaatggag
acatcatagg cctatacggc aatggagttg agcttggcga tggctcatac	5040 gtcagcgcca

tcgtgcaggg tgaccgtcag gaggaaccag tcccagaagc ttacactcca	5100 aacatgttaa
gaaagagaca gatgactgtg ttagatttgc accctgggtc agggaaaacc	5160 aggaaaattc
tgccacaaat aattaaggat gcaatccagc agcgcctaag aacagctgtg	5220 ttggcaccga
cgcggtggt agcagcagaa atggcagaag ctttgagagg gctcccagta	5280 cgataccaaa
cttcagcagt gcagagagag caccaaggga atgaaatagt ggatgtgatg	5340 tgccacgcca
ctctgacca cagattgatg tcaccgaaca gagtgcccaa ctacaatcta	5400 tttgtcatgg
atgaagctca tttcaccgac ccagccagca tagccgcacg aggatacatc	5460 gctaccaagg
tggaattagg agaggcagca gccatcttta tgacagcgac cccgcctgga	5520 accacggatc
ctttcccga ctcaaagcc ccaatccatg atttacaaga tgagatacca	5580 gacagggcat
ggagcagtgg atacgaatgg atcacagaat atgcgggtaa aaccgtgtgg	5640 tttgtggcga
gcgtaaaaat ggggaatgag attgcaatgt gcctccaaag agcgggaaaa	5700 aaggtcatcc
aactcaaccg caagtcctat gacacagaat acccaaatg taagaatgga	5760 gactgggatt
ttgtcattac caccgacatc tctgaaatgg gggctaactt cggtgcgagc	5820 agggtcacgc
actgcagaaa gagcgtgaaa cccaccatct tagaagaggg agaaggcaga	5880 gtcacctcgc
gaaacccatc tcccataacc agtgctagcg cagctcaacg gaggggcaga	5940 gtaggcagaa
acccaacca agttggagat gaataccatt atggaggggc taccagtga	6000 gatgacagta
acctagcca ttggacagag gcaaagatca tgttagacaa catacacatg	6060 cccaatgggc
tggtggccca gctctatgga ccagagaggg aaaaggcttt cacaatggat	6120 ggcgaatacc
gtctcagggg tgaagaaaag aaaaacttct tagagctgct taggacggct	6180 gaccttccgg
tgtggctggc ctataaggtg gcgtccaatg gcattcagta caccgacaga	6240 aagtgggtgtt
ttgatgggcc gcgcacgaat gccatactgg aggacaacac cgaggtagag	6300 atagtcaccc

ggatgggtga gagaaagatc ctcaagccga gatggcttga tgcaagagta	6360 tacgcagatc
accaagccct caagtgggtc aaagactttg cagcaggaaa gagatcggcc	6420 gttagcttca
tagaggtgct cggtcgcatt cctgagcatt tcatgggaaa gacgcgggaa	6480 gctttagaca
ccatgtactt ggtcgcaacg gctgagaaag gtgggaaggc acaccgaatg	6540 gctctcgaag
agttgccgga tgcactggaa accatcacac ttattgttgc catcactgta	6600 atgacaggag
gattcttctt actaatgatg cagcgaaagg gtataggga gatgggtctt	6660 ggagctctag
tgctcacgct agctaccttc ttctgtggg cggcagaggt tcctggaacc	6720 aaaatagcag
ggaccctgct gatcgccctg ctgctgatgg tggttctcat cccagaaccg	6780 gaaaaacaga
ggtcacagac agacaaccaa ctagcgggtg ttctcatctg cgtcttgacc	6840 gtggttggag
tggtggcagc aaacgagtac gggatgctag aaaaaaccaa agcagatctc	6900 aagagcatgt
ttggcggaaa gacacaggca tcaggactga ctggattgcc aagcatggca	6960 ctggacctgc
gtccagccac agcctgggca ctgtatgggg ggagcacagt tgtgctaacc	7020 cctcttctga
agcacctgat cacgtcgga tatgtacca catcgctagc ctcaattaac	7080 tcacaagctg
gtcattatt cgtcttgcca cgaggcgtgc ctttcaccga tctagacctg	7140 accgttggcc
tcgtcttctt tggctgctgg ggtcaaatca ccctcacaac gtttttgaca	7200 gccatggttc
tggcgacact tcactatggg tacatgctcc ctggatggca agcagaagca	7260 ctcagggctg
cccagagaag gacggcggct ggaataatga agaatgccgt tgttgacgga	7320 atggtcgcca
ctgatgtgcc tgaactggaa aggactactc ctctgatgca aaagaaagtc	7380 ggacaggtgc
tcctcatagg ggtgagcgtg gcagcgtttc tcgtcaacc taatgtcacc	7440 actgtgagag
aagcaggggt gttggtgacg gcggctacgc tcaccttgtg ggataatgga	7500 gccagtgccg
tttgggaattc caccacagcc acgggactct gccatgtcat gcgaggtagc	7560 tacctggctg

gaggctctat tgcttggact cttatcaaga acgctgacaa gccctccttg	7620 aaaaggggaa
ggcctggggg caggacgcta ggggagcagt ggaaggaaaa actaaatgcc	7680 atgagcagag
aagagttttt taaataccgg agagaggcca taatcgaggt ggaccgcact	7740 gaagcacgca
gggctagacg tgaaaataac atagtgggag gacatccggt ttcgcgaggc	7800 tcagcaaaac
tccgttggct cgtggagaaa ggattcgtct cgccaatagg aaaagtcatt	7860 gatctagggt
gtgggcgtgg aggatggagc tactacgcag caaccctgaa gaaggtccag	7920 gaagtcagag
gatacacgaa aggtggggcg ggacatgaag agccgatgct catgcagagc	7980 tacggctgga
acctggtctc cttgaagagt ggagtggatg tgttctacaa accttcagag	8040 cctagtgaca
ccctgttctg tgacataggg gaatcctccc caagtccaga agtggaaagaa	8100 caacgcacac
tacgcgtcct agagatgaca tccgattggt tgcacgagg acccagagag	8160 ttctgcataa
aagtctctg cccttacatg cccaaggtca tagaaaaaat ggaagtctg	8220 cagcgccgct
tcggaggtgg gctagtacgt ctccccctgt cccgaaactc caatcacgag	8280 atgtattggg
ttagtggagc cgctggcaat gtggtgcacg ctgtgaacat gaccagccag	8340 gtactactgg
ggcgaatgga tcgcacagtg tggagagggc caaagtatga ggaagatgtc	8400 aacctaggtg
gcggaacaag agccgtggga aagggagaag ttcatagcaa tcaggagaaa	8460 atcaagaaga
gaatccagaa gcttaaagaa gaattcgcca caacgtggca caaagaccct	8520 gaacacccat
accgcacttg gacataccac ggaagctatg aggtgaaggc tactggctca	8580 gccagctctc
tcgtcaacgg agtggatgaag ctcatgagta aaccttggga cgccattgcc	8640 aacgtcacca
ccatggccat gactgacacc accccttttg gacagcaaag agttttcaag	8700 gagaaagttg
acacgaaagc tcctgagcca ccagctggag tcaaggaagt gctcaacgag	8760 accaccaact
ggctgtgggc ccacttgtca cgggaaaaaa gaccccgctt gtgcaccaag	8820 gaagaattta

taaagaaagt caatagcaac gcggctcttg gagcagtgtt tgctgaacag	8880 aatcaatgga
gcacggcgcg tgaggctgtg gacgacccgc ggttttggga gatgggtcaat	8940 gaagagaggg
aaaaccatct gcgaggagag tgtcacacat gtatctacaa catgatggga	9000 aaaagagaga
agaagcctgg agagtttgga aaagctaaag ggagcagggc catttggttc	9060 atgtggcttg
gagcacggta tctagagttt gaagcttttg ggttcctgaa tgaagaccac	9120 tggctgagcc
gagagaattc aggaggtgga gtagaaggct caggcgtcca aaagttggga	9180 tacatcctcc
gtgacatagc aggaaagcaa ggagggaaaa tgtacgctga tgacaccgcc	9240 ggggtgggaca
ctagaattac tagaactgat ttagaaaatg aagctaagggt gctggagctc	9300 ctagatgggtg
aacaccgcat gctcgcccgg gccataattg aactgactta caggcacaaa	9360 gtggtcaagg
tcatgagacc tgcagcagaa ggaaagaccg tgatggacgt gatatcaaga	9420 gaagaccaaa
gggggagtggtg acaggtgggtc acttatgctc tcaacacttt cacgaacatc	9480 gctgtccagc
tcgttaggct gatggaggct gaggggggtca ttgggccaca acacttgga	9540 cagctgccta
ggaaaaacaa gatagctgtc aggacttggc tctttgagaa tggagaggag	9600 agagtgacca
ggatggcgat cagcggagac gactgtgtcg tcaagccgct ggacgacaga	9660 ttgccacagg
ccctccattt cctcaacgca atgtcaaagg ttagaaaaga catccaggaa	9720 tggaagcctt
cgcacggctg gcacgattgg cagcaagttc ctttctgctc taaccacttt	9780 caggagattg
tgatgaaaga cggaaggagt atagtgtcc cgtgcagagg acaggatgag	9840 ctgataggca
gggctcgcat ctctccagga gctggatgga atgtgaagga cacagcttgc	9900 ctggcaaaaag
catatgcaca gatgtggcta ctctatact tccatcgtag ggacctgcgt	9960 ctcatggcaa
atgcgatttg ctacagcagt ccagtggtt gggtgccac aggcaggaca	10020 tcctgggtcaa
tacactcgaa aggagagtgg atgaccacgg aagacatgct gcaggtctgg	10080 aacagagtct

ggattgaaga aaatgaatgg atgatggata agactccgt cacaagctgg 10140 acagacgttc
 cgtatgtggg aaagcgtgag gacatctggt gtggcagcct catcggaacg 10200 cgttccagag
 caacctgggc tgagaacatc tatgcggcga taaaccaggt tagagctgtc 10260 attgggaaag
 aaaattatgt tgactacatg acctcactca ggagatacga agacgtcttg 10320 atccaggaag
 acagggtcat ctagtgtgac ttaaggtaga aatgtaaata atgtgaatga 10380 gaaaatgcat
 gtatatggag tcaggccagc aaaagctgcc accggatact gggtagacgg 10440 tgctgcctgc
 gtctcagtcc caggaggact gggttaacaa atctgacaac agaaagttag 10500 aaagccctca
 gaaccgtctc ggaagtaggt ccctgctcac tggaagttga aagaccaacg 10560 tcaggccacg
 aatttgtgcc actccgttg ggagtgcggc ctgctcagcc ccaggaggac 10620 tgggttacca
 aagccgttga ggccccacg gcccaagcct cgtctaggat gcaatagacg 10680 aggtgtaagg
 actagagggt agaggagacc ccgtggaaac aacaacatgc ggccaagcc 10740 ccctcgaagc
 thtagaggag gtggaaggac tagaggttag aggagacccc gcatttgcatt 10800 caaacagcat attgacac
 10818 <210> 10 <211> 27 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
 synthetic oligodeoxyribonucleotide T <400> 10 ccagtgttgt ggcctgcagg gcgaatt
 27 <210> 11 <211> 27 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
 oligonucleotide TR, which is complementary to oligonucleotide T of the SEQ.
 ID. No. 10 <400> 11 gatgaattcg ccctgcaggc cacaaca
 27 <210> 12 <211> 18 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
 primer J35, complementary to nt 10259-10276 of the JEV genome <400> 12 agcaacctgg
 gctgagaa 18 <210> 13 <211>
 18 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> primer J40, complementar

to nt 215-232 of the JEV genome <400> 13 aaacgtactg gtcctctg

18 <210> 14 <211> 18 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

primer J39, which is complementary to nt 164-181 of the JEV genome <400>

14 ccactagt ggaatagc 18 <210>

15 <211> 10968 <212> DNA <213> Japanese encephalitis virus <400> 15

agaagtttat ctgtgtgaac ttcttggctt agtatcggtt agaagaatcg agagattagt 60

gcagttttaa cagtttttta gaacggaaga taacctgac taaaaaacca ggagggcccg 120

gtaaaaaccg ggctatcaat atgctgaaac gcggcctacc ccgcgtattc ccactagtgg 180

gagtgaagag ggtagtaatg agcttgttgg acggcagagg accagtacgt ttcgtgctgg 240

ctcttatcac gtcttcaag ttacagcat tagccccgac caaggcgctt ttaggccgat 300

ggaaagcagt ggaaaagagt gtggcaatga aacatcttac tagtttcaaa cgagaacttg 360

gaacactcat tgacgccgtg aacaagcggg gcagaaagca aaacaaaaga ggaggaaatg 420

aaggctcaat catgtggctc gcgagtttgg cagttgtcat agcttgtgta ggagccatga 480

agttgtcaaa ttccaaggg aagcttttga tgaccattaa caacacggac attgcagacg 540

tcacgtgat tcctacctca aaaggagaga acagatgctg ggtccgggca atcgatgtcg 600

gctacatgtg tgaggacact atcacgtacg aatgtcctaa gcttaccatg ggcaatgatc 660

cagaggatgt ggattgctgg tgtgacaacc aagaagtcta cgtccaatat ggacgggtgca 720

cgcgaccag gcattccaag cgaagcagga ggtccgtgtc ggtccaaaca catggggaga 780

gttcactagt gaataaaaaa gaggcttggc tggattcaac gaaagccaca cgatatctca 840

tgaaaactga gaactggatc ataaggaatc ctggctatgc tttcctggcg gcggtacttg 900

gctggatgct tggcagtaac aatgggtcaac gcgtgggtgtt taccatctc ctgctgttgg 960

tcgctccggc ttacagtttt aattgtctgg gaatgggcaa cctgacttc atagaaggag	1020
ccagtggagc cacttgggtg gacttagtgc tagaaggaga tagctgcttg acaatcatgg	1080
caaacgacaa accaacattg gacgtccgca tgattaacat cgaagccagc caacttgctg	1140
aggtcagaag ctattgctat catgcttcag tctactgacat ctcgacggtg gctcgggtgcc	1200
ccacgactgg agaagcccac aacgagaagc gagctgatag tagctatgtg tgcaaacaag	1260
gtttcactga tcgtgggtgg ggcaacggat gtggactttt cggaaggga agcattgaca	1320
catgtgcaaa attctcctgc accagtaagg cgattgggag aacaatccag ccagaaaaca	1380
tcaaatacga agttggcatt tttgtgcatg gaaccaccac ctcggaaaac catgggaatt	1440
attcagcgca agtaggggcg tcccaggcgg caaagtttac agtaacaccc aatgctcctt	1500
cgataaccct caaacttggg gactacggag aagtcacact ggactgtgaa ccaaggagtg	1560
gactgaacac tgaagcgttt tacgtcatga ccgtggggtc aaagtcattt ctggtccata	1620
gggaatggtt tcatgacctc gctctcccct ggacgtcccc ttcgagcaca gcgtggagaa	1680
acagagaact cctcatggaa tttgaagagg cgcacgccac aaaacagtcc gttgttgctc	1740
ttgggtcaca ggaaggaggc ctccatcagg cgctggcagg agccatcgtg gtggagtact	1800
caagctcagt gaagttaaca tcaggccacc tgaaatgtag gctgaaaatg gacaaactgg	1860
ctctgaaagg cacaacctat ggcatgtgta cagaaaaatt ctcgttcgcg aaaaatccgg	1920
cggacactgg ccacggaaca gttgtcattg aactctccta ttctgggagt gatggcccct	1980
gcaaaattcc gattgtctcc gttgcgagcc tcaatgacat gacccccgtt gggcggctgg	2040
tgacagtga ccccttcgtc gcgacttcca gtgccaaactc aaaggtgctg gtcgagatgg	2100
aacccccctt cggagactcc tacatcgtag ttggaagggg agacaagcag atcaaccacc	2160
attggcataa agctggaagc acgctgggca aggctttttc aacaactttg aaggagctc	2220

aaagactggc agcgttgggc gacacagcct gggactttgg ctctattgga ggggtcttca	2280
actccatagg aaaggccgtt caccaagtgt ttggtggcgc tttcagaaca ctctttgggg	2340
gaatgtcttg gatcacacaa gggttaatgg gtgccctact actctggatg ggcatcaacg	2400
cacgagatcg atcaattgct ttggccttct tggccacagg aggtgtgctc gtgttcttag	2460
cgaccaatgt gcatgctgac actggatgtg ccattgacat cgcaagaaaa gagatgagat	2520
gcggaagtgg catcttcgtg cacaacgacg tggaagcctg ggtggatagg tataaatatt	2580
tgccagaaac gcccagatcc ctagcgaaga tcgtccacaa agcgcacaag gaaggcgtgt	2640
gcggagtcag atctgtcact agactggagc accaaatgtg ggaagccgtg cgggacgaat	2700
tgaacgtcct gctcaaagag aatgcagtgg acctcagtgt ggttgtgaac aagcccgtgg	2760
ggagatatcg ctccagccca aaacgcctgt ccatgacgca agagaagttt gaaatgggct	2820
ggaaagcatg gggaaaaagc attctctttg ccccggaatt ggctaactcc acatttgttg	2880
tagatggacc tgagacaaag gaatgtcctg atgagcacag agcctggaac agcatgcaaa	2940
tcgaagactt cggcttttgt atcacatcaa cccgtgtgtg gctgaagatt agagaggaaa	3000
gcactgacga gtgtgatgga gcgatcatag gcacagctgt caaaggacat gtggcagttc	3060
atagtgactt gtcgtactgg attgagagtc gctacaacga cacatggaaa cttgagaggg	3120
cagtcttttg agagggtcaaa tcttgactt ggccagagac acacactctt tggggagatg	3180
gtgttgagga aagtgaactc atcatccgc ataccatagc cggaccaaaa agcaagcaca	3240
atcggaggga aggttcaaaa acacaaaacc agggaccttg ggacgaaaac ggcatagtct	3300
tggactttga ttattgcca gggacaaaag tcaccatcac agaggattgt ggcaagagag	3360
gcccttcggt cagaaccact actgacagtg gaaagttgat tactgactgg tgctgtcgca	3420
gttgctccct tccgccccta cgattccgga cagaaaatgg ctgctggtac ggaatggaaa	3480

tcagacctgt taggcatgat gaaacaacac tcgtcagatc acaggttgat gctttcaatg	3540
gtgaaatggt tgaccctttt cagctgggcc ttctggtgat gtttctggcc acccaggagg	3600
tccttcgcaa gaggtggacg gccagattga ccattcctgc ggttttgggg gccctgcttg	3660
tgctgatgct tgggggcatc acttacactg atttggcgag gtatgtggtg ctagtcgctg	3720
ctgctttcgc agaggccaat aatggaggag acgtcctgca ccttgctttg attgccgttt	3780
ttaagatcca accagctttt ctagtgatga acatgcttag cacgagatgg acgaaccaag	3840
aaaacgtggt cctggtccta ggggctgcct tctttcaatt ggcctcagta gatctgcaaa	3900
tcggagtcca cggaatcctg aatgccgccg ctatagcatg gatgattgtt cgagcgatca	3960
ccttccccac aacctctcc gtcaccatgc cagtcttagc gcttctaact ccgggaatga	4020
gggctctata cctagacact tacagaatca tccttctcgt catagggatt tgctccctgc	4080
tgcaagagag gaaaaagacc atggcaaaaa agaaaggagc tgtactcttg ggcttagcgc	4140
tcacatccac tggatggttc tcgcccacca ccatagctgc tggacttatg gtctgcaacc	4200
caaacaagaa gagagggtgg ccagctactg agtttctgtc ggcagtcgga ttgatgtttg	4260
ccatcgtagg tggtttggcc gagttggata ttgaatccat gtcaataccc ttcatgctgg	4320
caggtcttat ggcagtgtcc tacgtagtgt caggaaaagc aacagatatg tggctcgaac	4380
gggccgccga catcagctgg gagatggatg ctgcaatcac aggaagcagt cggaggctgg	4440
atgtgaaact ggatgatgac ggagattttc acttgattga tgatcccggc gttccatgga	4500
aagtttgggt cttgcgcatg tcttgcatg gcttagccgc cctcacgcct tgggccattg	4560
ttcccgccgc ttctcggttac tggctcactt taaaaacaac aaaaagaggg ggcgtgtttt	4620
gggacacgcc atccccgaaa ccttgcttaa aaggagacac cactacagga gtctaccgaa	4680
tcatggctag agggattctt ggcacctacc aggctggcgt cggagtcatg tacgagaatg	4740

ttttccacac actatggcac acaactagag gggcagccat tatgagtgga gaaggaaaat	4800
tgacgccata ctggggtagc gtgaaagaag accgcatagc ttacggaggc ccatggagat	4860
ttgatcgaat atggaatgga acagatgacg tgcaagtgat cgtggtagaa ccggggaagg	4920
ctgcggtaaa catccagaca aaaccaggag tgtttcggac ccccttcggg gaggttgggg	4980
ctgttagcct ggattaccg cgaggaacat ccggctcacc cattctggat tccaatggag	5040
acatcatagg cctatacggc aatggagttg agcttggcga tggctcatac gtcagcgcca	5100
tctgtcaggg tgaccgtcag gaggaaccag tcccagaagc ttacactcca aacatgttaa	5160
gaaagagaca gatgactgtg ttagatttgc accctggttc agggaaaacc aggaaaattc	5220
tgccacaaat aattaaggat gcaatccagc agcgcctaag aacagctgtg ttggcaccga	5280
cgcggtggt agcagcagaa atggcagaag ctttgagagg gctcccagta cgatacaaaa	5340
cttcagcagt gcagagagag caccaaggga atgaaatagt ggatgtgatg tgccacgcca	5400
ctctgacca cagattgatg tcaccgaaca gaggcccaa ctacaatcta tttgtcatgg	5460
atgaagctca tttcaccgac ccagccagca tagccgcacg aggatacatc gctaccaagg	5520
tggaattagg agaggcagca gccatcttta tgacagcgac cccgcctgga accacggatc	5580
cttttcccga ctcaaagcc ccaatccatg atttacaaga tgagatacca gacagggcat	5640
ggagcagtgg atacgaatgg atcacagaat atgcgggtaa aaccgtgtgg tttgtggcga	5700
gcgtaaaaat ggggaatgag attgcaatgt gcctccaaag agcgggaaaa aaggatcatc	5760
aactcaaccg caagtcctat gacacagaat acccaaatg taagaatgga gactgggatt	5820
ttgtcattac caccgacatc tctgaaatgg gggctaactt cggtgcgagc agggatcatc	5880
actgcagaaa gagcgtgaaa cccaccatct tagaagaggg agaaggcaga gtcacctcg	5940
gaaacccatc tcccataacc agtgctagcg cagctcaacg gaggggcaga gtaggcagaa	6000

acccaacca agttggagat gaataccatt atggaggggc taccagtga gatgacagta	6060
acctagccca ttggacagag gcaaagatca tgtagacaa catacacatg ccaatgggc	6120
tggtggccca gctctatgga ccagagaggg aaaaggcttt cacaatggat ggcgaatacc	6180
gtctcagggg tgaagaaaag aaaaacttct tagagctgct taggacggct gaccttccgg	6240
tgtggctggc ctataagggtg gcgtccaatg gcattcagta caccgacaga aagtgggtgtt	6300
ttgatgggcc gcgcacgaat gccatactgg aggacaacac cgaggtagag atagtcaccc	6360
ggatgggtga gagaaagatc ctcaagccga gatggcttga tgcaagagta tacgcagatc	6420
accaagccct caagtggttc aaagactttg cagcaggaaa gagatcggcc gttagcttca	6480
tagaggtgct cggtcgcatg cctgagcatt tcatgggaaa gacgcgggaa gctttagaca	6540
ccatgtactt ggtcgcaacg gctgagaaag gtgggaaggc acaccgaatg gctctcgaag	6600
agttgccgga tgactggaa accatcacac ttattgttgc catcactgta atgacaggag	6660
gattcttcct actaatgatg cagcgaaagg gtatagggaa gatgggtctt ggagctctag	6720
tgctcacgct agctaccttc ttctgtggg cggcagaggt tcttgaacc aaaatagcag	6780
ggaccctgct gatcgccctg ctgctgatgg tggttctcat ccagaaccg gaaaaacaga	6840
ggtcacagac agacaaccaa ctacgggtgt ttctcatctg cgtcttgacc gtggttgag	6900
tggtggcagc aaacgagtac gggatgctag aaaaaaccaa agcagatctc aagagcatgt	6960
ttggcggaaa gacacaggca tcaggactga ctggattgcc aagcatggca ctggacctgc	7020
gtccagccac agcctgggca ctgtatgggg ggagcacagt tgtgctaacc cctcttctga	7080
agcacctgat cacgtcgga tatgtacca catcgctagc ctcaattaac tcacaagctg	7140
gtcattatt cgtcttgcca cgaggcgtgc ctttcaccga tctagacctg accgttggcc	7200
tcgtcttcct tggctgctgg ggtcaaatca cctcacaac gtttttgaca gccatggttc	7260

tggcgacact tcactatggg tacatgctcc ctggaiggca agcagaagca ctcagggtg	7320
cccagagaag gacggcggct ggaataatga agaatgccgt tgttgacgga atggctgcc	7380
ctgatgtgcc tgaactggaa aggactactc ctctgatgca aaagaaagtc ggacaggtgc	7440
tcctcatagg ggtgagcgtg gcagcgtttc tcgtcaaccc taatgtcacc actgtgagag	7500
aagcaggggt gttgggtgacg gcggctacgc tcaccttgtg ggataatgga gccagtgccg	7560
tttggaaattc caccacagcc acgggactct gccatgtcat gcgaggtagc tacctggctg	7620
gaggctctat tgcttggact cttatcaaga acgctgacaa gccctccttg aaaaggggaa	7680
ggcctggggg caggacgcta ggggagcagt ggaaggaaaa actaaatgcc atgagcagag	7740
aagagttttt taaataccgg agagaggcca taatcgaggt ggaccgcact gaagcacgca	7800
gggctagacg tgaaaataac atagtgggag gacatccgtt ttcgcgaggc tcagcaaaac	7860
tccgttggct cgtggagaaa ggattcgtct cgccaatagg aaaagtcatt gatctagggt	7920
gtgggcgtgg aggatggagc tactacgcag caaccctgaa gaaggtccag gaagtcagag	7980
gatacacgaa aggtggggcg ggacatgaag agccgatgct catgcagagc tacggctgga	8040
acctggtctc cttgaagagt ggagtggatg tgttctacaa accttcagag cctagtgaca	8100
ccctgttctg tgacataggg gaatcctccc caagtccaga agtggaagaa caacgcacac	8160
tacgcgtcct agagatgaca tccgattggg tgcacgagg acccagagag ttctgcataa	8220
aagtctcttg cccttacatg cccaaggtca tagaaaaaat ggaagttctg cagcgccgt	8280
tcggaggtgg gctagtacgt ctccccctgt ccgaaactc caatcacgag atgtattggg	8340
ttagtggagc cgctggcaat gtggcgcacg ctgtgaacat gaccagccag gtactactgg	8400
ggcgaatgga tcgcacagtg tggagagggc caaagtatga ggaagatgtc aacctaggt	8460
gcggaacaag agccgtggga aagggagaag ttcatagcaa tcaggagaaa atcaagaaga	8520

gaatccagaa gcttaaagaa gaattcgcca caacgtggca caaagaccct gaacacccat	8580
accgcacttg gacataccac ggaagctatg aggtgaaggc tactggctca gccagctctc	8640
tcgtcaacgg agtgggtgaag ctcatgagta aaccttggga cgccattgcc aacgtcacca	8700
ccatggccat gactgacacc accccttttg gacagcaaag agttttcaag gagaaagttg	8760
acacgaaagc tcctgagcca ccagctggag tcaaggaagt gctcaacgag accaccaact	8820
ggctgtgggc ccacttgtca cgggaaaaaa gaccccgctt gtgcaccaag gaagaattta	8880
taaagaaagt caatagcaac gcggctcttg gagcagtgtt tgctgaacag aatcaatgga	8940
gcacggcgcg tgaggctgtg gacgaccgcg ggttttggga gatgggtcaat gaagagaggg	9000
aaaaccatct gcgaggagag tgtcacacat gtatctacaa catgatggga aaaagagaga	9060
agaagcctgg agagtttgga aaagctaaag ggagcagggc catttgggtc atgtggcttg	9120
gagcacggta tctagagttt gaagcttttg ggttcctgaa tgaagaccac tggctgagcc	9180
gagagaattc aggaggtgga gtagaaggct caggcgtcca aaagtiggga tacatcctcc	9240
gtgacatagc aggaaagcaa ggagggaaaa tgtacgtga tgacaccgcc gggtgggaca	9300
ctagaattac tagaactgat ttagaaaatg aagctaaggt gctggagctc ctagatgggtg	9360
aacaccgcat gctcgcccg gccataattg aactgactta caggcacaaa gtgggtcaagg	9420
tcatgagacc tgcagcagaa ggaaagaccg tgatggacgt gatatcaaga gaagaccaaa	9480
gggggagtg acaggtggtc acttatgctc tcaacacttt cacgaacatc gctgtccagc	9540
tcgttaggct gatggaggct gaggggggtca ttgggccaca acacttgga cagctgccta	9600
ggaaaaacaa gatagctgtc aggacttggc tctttgagaa tggagaggag agagtgacca	9660
ggatggcgat cagcggagac gactgtgtcg tcaagccgct ggacgacaga ttcgccacgg	9720
ccctccattt cctcaacgca atgtcaaagg ttagaaaaga catccaggaa tggaagcctt	9780

cgcacggctg gcacgattgg cagcaagttc ccttctgctc taaccacttt caggagattg 9840
 tgatgaaaga cggaaggagt atagtgtgcc cgtgcagagg acaggatgag ctgataggca 9900
 gggctcgcat ctctccagga gctggatgga atgtgaagga cacagcttgc ctggcaaaag 9960
 catatgcaca gatgtggcta ctctataact tccatcgtag ggacctgctg ctcatggcaa 10020
 atgcgatttg ctacagcagt ccagtggatt gggtgccac aggacaggaca tcctgggtcaa 10080
 tacactcgaa aggagagtgg atgaccacgg aagacatgct gcaggtctgg aacagagtct 10140
 ggattgaaga aaatgaatgg atgatggata agactcccgt cacaagctgg acagacgttc 10200
 cgtatgtggg aaagcgtgag gacatctggt gtggcagcct catcggaacg cgttccagag 10260
 caacctgggc tgagaacatc tatgcggcga taaaccaggt tagagctgtc attgggaaag 10320
 aaaattatgt tgactacatg acctcactca ggagatacga agacgtcttg atccaggaag 10380
 acagggtcat ctagtgtgac ttaaggtaga aatgtaaata atgtgaatga gaaaatgcat 10440
 gtatatggag tcaggccagc aaaagctgcc accggatact gggtagacgg tgctgcctgc 10500
 gtctcagtcc caggaggact gggttaacaa atctgacaac agaaagttag aaagccctca 10560
 gaaccgtctc ggaagtaggt ccctgctcac tggaagttag aagaccaacg tcaggccacg 10620
 aatttgtgcc actccgctgg ggagtgcggc ctgcgcagcc ccaggaggac tgggttacca 10680
 aagccgttga ggccccacg gcccaagcct cgtctaggat gcaatagacg aggtgtaagg 10740
 actagagggt agaggagacc ccgtggaaac aacaacatgc ggccaagcc ccctcgaagc 10800
 tgtagaggag gtggaaggac tagaggtag aggagacccc gcatttgcac caaacagcat 10860
 attgacacct gggaatagac tgggagatct tctgctctat ctcaacatca gctactaggc 10920
 acagagcgcc gaagtatgta gctgggtggg aggaagaaca caggatct 10968 <210>

16 <211> 18 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> primer J41

<400> 16 tccgtggaat gaacaatg
 18 <210> 17 <211> 30 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
 primer J43 <400> 17 acagataaac ttctctatag tgtcccctaa
 30 <210> 18 <211> 18 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
 primer J42 <400> 18 gagaagttaa tctgtgtg
 18 <210> 19 <211> 18 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
 primer J40 <400> 19 aaacgtactg gtcctctg
 18 <210> 20 <211> 20 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
 primer J90 <400> 20 ttgaggcccc cacggcccaa
 20 <210> 21 <211> 41 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
 primer J45 <400> 21 agtactagtc ggtccgcggc cgctcgagat cctgtgttct t
 41 <210> 22 <211> 18 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
 primer J31 <400> 22 ggctgtgggc ccacttgt
 18 <210> 23 <211> 24 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
 primer J47 <400> 23 ccaaagcttc aaactcaaga tacc
 24 <210> 24 <211> 43 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
 primer J46 <400> 24 agtactagtc ggtccgcggc cgctctagag atcctgtgtt ctt
 43 <210> 25 <211> 18 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
 primer J81 <400> 25 tcttgcccgcc ctgatgaa
 18 <210> 26 <211> 30 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
 primer J80 <400> 26 acagataaac ttctctatag tgagtcgtat

30 <210> 27 <211> 18 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

primer J42 <400> 27 gagaagttaa tctgtgtg

18 <210> 28 <211> 18 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

primer J82 <400> 28 gcccatggta agcttagg

18 <210> 29 <211> 27 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

primer J48 <400> 29 actgagctca cgcgtcctcg agatgac

27 <210> 30 <211> 30 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

primer J3 <400> 30 gatttaatta acacctcctc tacagcttcg

30 <210> 31 <211> 20 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

primer J72 <400> 31 gaaggtaccc cattgtatgg

20 <210> 32 <211> 30 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

primer J73 <400> 32 ttctccttta cccatggttg tggcaagctt

30 <210> 33 <211> 18 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

primer J74 <400> 33 atgggtaaag gagaagaa

18 <210> 34 <211> 30 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

primer J75 <400> 34 aagatgcatt cattaaccgt cgactgcaga

30 <210> 35 <211> 30 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

primer J76 <400> 35 tttggcgtct tccatggttg tggcaagctt

30 <210> 36 <211> 18 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

primer J77 <400> 36 atggaagacg ccaaaaac

18 <210> 37 <211> 30 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

primer J78 <400> 37 ctttaagatgc attcattaca cggcgatctt

30 <210> 38 <211> 20 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

primer J90 <400> 38 tgctttggcc ttcttggcca

20 <210> 39 <211> 30 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

primer J91 <400> 39 acccgcatat tctgtgatcc gtggttccag

30 <210> 40 <211> 18 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

primer J92 <400> 40 acagaatatg cgggtaaa

18 <210> 41 <211> 21 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

primer J93 <400> 41 agctaacggc cgatctcttt c

21 <210> 42 <211> 16847 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

sequence for pBAC/SV vector <400> 42 attgacggcg tagtacacac tattgaatca aacagccgac

caattgcact accatcacaa 60 tggagaagcc agtagtaaac gtagacgtag acccccagag

tccgtttgtc gtgcaactgc 120 aaaaaagctt cccgcaattt gaggtagtag cacagcaggt

cactccaaat gaccatgcta 180 atgccagagc attttcgcat ctggccagta aactaatcga

gctggagggt cctaccacag 240 cgacgatctt ggacataggc agcgcaccgg ctcgtagaat

gttttccgag caccagtatc 300 attgtgtctg ccccatgcgt agtccagaag acccggaccg

catgatgaaa tacgccagta 360 aactggcgga aaaagcgtgc aagattacaa acaagaactt

gcatgagaag attaaggatc 420 tccggaccgt acttgatacg ccggatgctg aaacaccatc

gctctgcitt cacaacgatg 480 ttacctgcaa catgcgtgcc gaatattccg tcatgcagga

cgtgtatatc aacgctcccg 540 gaactatcta tcatcaggct atgaaaggcg tgcggaccct

gtactggatt ggcttcgaca 600 ccaccagtt catgttctcg gctatggcag gticgtaccc

tgcgtacaac accaactggg
cagcaciaag ctgagtgaag
gaagcccggg tcgcggttt
cagcttgacag agctggcatc
ttgccgtgt gatacagtgg
tcccgggatc acgggagaaa
gctatgcaaa gttactgaca
catcccggcc accatatgcg
cgatgcacaa aaacttctgg
caggaacacc aacaccatgc
atgggctaag gagcgcaagg
caagcttacg tatggctgct
cccacctgga acgcagacct
gtccgtatgg acgacctctt
accaaagaag gaggaaaaac
tgcttttgag gatgctcagg
attagtggca gacaaaggca
ccaggcggac atcggagcag
tcaagcaaat gaccgtatga
gaatgccaaa ctgcaccag
cggaagatca ggaaggtacg

660 ccgacgagaa agtccttgaa gcgcgtaaca tcggactttg
720 gtaggacagg aaaattgtcg ataatgagga agaaggagtt
780 atttctccgt aggatcgaca ctttatccag aaacacagagc
840 ttccatcggg gttccacttg aatggaaagc agtcgtacac
900 tgagttgcga aggctacgta gtgaagaaaa tcaccatcag
960 ccgtgggata cgcggttaca cacaatagcg agggcttctt
1020 cagtaaaagg agaacgggta tcgttccttg tgtgcacgta
1080 atcagatgac tggatataatg gccacggata tatcacctga
1140 ttgggctcaa ccagcgaatt gtcattaacg gtaggactaa
1200 aaaattacct tctgccgatc atagcacaag ggttcagcaa
1260 atgatcttga taacgagaaa atgctgggta ctagagaacg
1320 tgtgggcgtt tcgcactaag aaagtacatt cgttttatcg
1380 gcgtaaaagt ccagacctct tttagcgctt ttcccatgtc
1440 tgcccatgtc gctgaggcag aaattgaaac tggcattgca
1500 tgctgcaggt ctcgaggagaa ttagtcatgg aggccaaggc
1560 aggaagccag agcggagaag ctccgagaag cacttccacc
1620 tcgaggcagc cgcagaagtt gtctgcgaag tggaggggct
1680 cattagttag aaccccgcgc ggtcacgtaa ggataatacc
1740 tcggacagta tatcgttgtc tcgccaaact ctgtgctgaa
1800 cgcacccgct agcagatcag gtttaagatca taacacactc
1860 cggtcgaacc atacgacgct aaagtactga tgccagcagg

aggtgccgta ccatggccag
 cgaaagagag tttgtgaacc
 tacagaagag gagcagtaca
 tgacgtggac aagaagcggt
 agaactgacc aaccctccct
 ggtcccgtac aaggtcgaaa
 tattatcaag tcaactgtca
 tcgcgaaatt gaggccgacg
 agattcggtt atgctcaacg
 gttcgcgtgc cacgcaggag
 ggtagtacta tgcggagacc
 acatttcaat caccctgaaa
 gcgttgacaca cagccagtta
 aaccacgaac ccgtgcaaga
 gccaggggat atcatcctga
 tcccgacat gaagtaatga
 tgccgtccgg caaaaagtca
 cgtgttgctc acccgcactg
 gattaagcag cccactaaca
 agctgaacac aagggaataa
 cagctgcaag accaacgttt

1920 aattcctagc actgagtgag agcgccacgt tagtgtacaa
 1980 gcaaactata ccacattgcc atgcatggcc ccgccaagaa
 2040 aggttacaaa ggcagagctt gcagaaacag agtacgtgtt
 2100 gcgttaagaa ggaagaagcc tcaggctctgg tcctctcggg
 2160 atcatgagct agctctggag ggactgaaga cccgacctgc
 2220 caataggagt gataggcaca ccggggtcgg gcaagtcagc
 2280 cggcacgaga tcttggttacc agcggaaaaga aagaaaattg
 2340 tgctaagact gaggggtatg cagattacgt cgaagacagt
 2400 gatgccacaa agccgtagaa gtgctgtacg ttgacgaagc
 2460 cactacttgc ctigattgct atcgtcaggc cccgcaagaa
 2520 ccatgcaatg cggattcttc aacatgatgc aactaaaggt
 2580 aagacatatg caccaagaca ttctacaagt atatctcccg
 2640 cagctattgt atcgacactg cattacgatg gaaagatgaa
 2700 agaacattga aatcgatatt acaggggcca caaagccgaa
 2760 catgtttccg cgggtgggtt aagcaattgc aaatcgacta
 2820 cagccgcggc ctcaaaagg ctaaccagaa aaggagtgtg
 2880 atgaaaaccc actgtacgcg atcacatcag agcatgtgaa
 2940 aggacaggct agtgtggaaa accttgacagg gcgacccatg
 3000 tacctaaagg aaactttcag gctactatag aggactggga
 3060 ttgctgcaat aaacagcccc actccccgtg ccaatccgtt
 3120 gctgggcgaa agcattggaa ccgatactag ccacggccgg

tatcgtaactt accggttgcc	3180 agtggagcga actgttccca cagtttgagg atgacaaacc
acattcggcc atttacgcct	3240 tagacgtaat ttgcattaag ttttcggca tggacttgac
aagcggactg ttttctaaac	3300 agagcatccc actaacgtac catcccggcg attcagcgag
gccggtagct cattgggaca	3360 acagcccagg aaccgcaag tatgggtacg atcacgcat
tgccgccgaa ctctccgta	3420 gatttcgggt gttccagcta gctgggaagg gcacacaact
tgatttgag acggggagaa	3480 ccagagttat ctctgcacag cataacctgg tcccggtgaa
ccgcaatctt cctcacgcct	3540 tagtccccga gtacaaggag aagcaaccg gcccggtcaa
aaaattcttg aaccagttca	3600 aacaccactc agtactgtg gtatcagagg aaaaaattga
agctccccgt aagagaatcg	3660 aatggatcgc cccgattggc atagccggtg cagataagaa
ctacaacctg gctttcgggt	3720 ttccgccgca ggcacggtag gacctggtgt tcatcaacat
tggaaactaa tacagaaacc	3780 accactttca gcagtgcgaa gaccatgcgg cgaccttaaa
aaccctttcg cgttcggccc	3840 tgaattgcct taacctagga ggcaccctcg tggatgaagtc
ctatggctac gccgaccgca	3900 acagtgagga cgtagtcacc gctcttgcca gaaagtttgt
cagggtgtct gcagcgagac	3960 cagattgtgt ctcaagcaat acagaaatgt acctgatttt
ccgacaacta gacaacagcc	4020 gtacacggca attcaccgac caccatctga attgcgtgat
ttcgtccgtg tatgagggtg	4080 caagagatgg agttggagcc gcgccgtcat accgcacaa
aaggggagaat attgctgact	4140 gtcaagagga agcagttgtc aacgcagcca atccgctggg
tagaccaggc gaaggagtct	4200 gccgtgcat ctataaacgt tggccgacca gttttaccga
ttcagccacg gagacaggca	4260 ccgcaagaat gactgtgtgc ctaggaaaga aagtatcca
cgcggtcggc cctgatttcc	4320 ggaagcacc agaagcagaa gccttgaaat tgctacaaaa
cgcctaccat gcagtggcag	4380 acttagtaaa tgaacataac atcaagtctg tcgccattcc

actgctatct acaggcattt	4440 acgcagccgg aaaagaccgc ctigaagtat cacttaactg
cttgacaacc gcgctagaca	4500 gaactgacgc ggacgtaacc atctattgcc tggataagaa
gtggaaggaa agaatcgacg	4560 cggcactcca acttaaggag tctgtaacag agctgaagga
tgaagatatg gagatcgacg	4620 atgagttagt atggattcat ccagacagtt gcttgaaggg
aagaaaggga ttcagtacta	4680 caaaaggaaa attgtattcg tacttcgaag gcaccaaatt
ccatcaagca gcaaaagaca	4740 tggcggagat aaaggtcctg ttcctaata accaggaaag
taatgaacaa ctgtgtgcct	4800 acatattggg tgagaccatg gaagcaatcc gcgaaaagt
cccggtcgac cataaccgt	4860 cgtctagccc gcccaaacg ttgccgtgcc tttgcatgta
tgccatgacg ccagaaaggg	4920 tccacagact tagaagcaat aacgtcaaag aagttacagt
atgctcctcc accccccttc	4980 ctaagcacia aattaagaat gttcagaagg ttcagtgcac
gaaagtagtc ctgtttaatc	5040 cgcacactcc cgcattcgtt cccgcccgtg agtacataga
agtgccagaa cagcctaccg	5100 ctccctcctgc acaggccgag gaggcccccg aagttgtagc
gacaccgtca ccatctacag	5160 ctgataacac ctgccttgat gtcacagaca tctcactgga
tatggatgac agtagcgaag	5220 gctcactttt ttcgagcttt agcggatcgg acaactctat
tactagtatg gacagttggt	5280 cgtcaggacc tagttcacta gagatagtag accgaaggca
ggtggtggtg gctgacgttc	5340 atgccgtcca agagcctgcc cctattccac cgccaaggct
aaagaagatg gcccgctgg	5400 cagcggcaag aaaagagccc actccaccgg caagcaatag
ctctgagtcc ctccacctct	5460 cttttggtgg ggtatccatg tcctcggat caattttcga
cggagagacg gcccgccagg	5520 cagcgggtaca acccctggca acaggcccca cggatgtgcc
tatgtctttc ggatcgTTTT	5580 ccgacggaga gattgatgag ctgagccgca gagtaactga
gtccgaaccc gtcctgtttg	5640 gatcatttga accgggCGAA gtgaactcaa ttatatcgTC

ccgatcagcc gtatcttttc	5700 cactacgcaa gcagagacgt agacgcagga gcaggaggac
tgaatactga ctaaccgggg	5760 taggtgggta catatcttcg acggacacag gccctgggca
cttgcaaaag aagtccgttc	5820 tgcagaacca gcttacagaa ccgaccttgg agcgcaatgt
cctggaaaga attcatgccc	5880 cgggtgctcga cacgtcgaaa gaggaacaac tcaaactcag
gtaccagatg atgcccaccg	5940 aagccaacaa aagtaggtac cagtctcgta aagtagaaaa
tcagaaagcc ataaccactg	6000 agcgactact gtcaggacta cgactgtata actctgccac
agatcagcca gaatgctata	6060 agatcaccta tccgaaacca ttgtactcca gtagcgtacc
ggcgaactac tccgatccac	6120 agttcgctgt agctgtctgt aacaactatc tgcattgagaa
ctatccgaca gtagcatctt	6180 atcagattac tgacgagtac gatgcttact tggatatggt
agacggggaca gtcgcctgcc	6240 tggatactgc aaccttctgc cccgctaagc ttagaagtta
cccgaaaaaa catgagtata	6300 gagccccgaa tatccgcagt gcggttccat cagcgatgca
gaacacgcta caaaatgtgc	6360 tcattgccgc aactaaaaga aattgcaacg tcacgcagat
gcgtgaactg ccaacactgg	6420 actcagcgac attcaatgtc gaatgctttc gaaaatatgc
atgtaatgac gagtattggg	6480 aggagttcgc tcggaagcca attaggatta ccactgagtt
tgtcaccgca tatgtagcta	6540 gactgaaagg ccctaaggcc gccgcactat ttgcaaagac
gtataatttg gtcccattgc	6600 aagaagtgcc tatggataga ttcgtcatgg acatgaaaag
agacgtgaaa gttacaccag	6660 gcacgaaaca cacagaagaa agaccgaaag tacaagtgat
acaagccgca gaacccctgg	6720 cgactgctta cttatgcggg attcaccggg aattagtgcg
taggcttacg gccgtcttgc	6780 ttccaaacat tcacacgctt tttgacatgt cggcggagga
ttttgatgca atcatagcag	6840 aacacttcaa gcaaggcgac ccggtactgg agacggatat
cgcatcattc gacaaaagcc	6900 aagacgacgc tatggcgcta accggtctga tgatcttgg

ggacctgggt gtggatcaac
 atccacccat ctacctacgg
 gttcctcaca ctttttgtca
 agagcggctt aaaacgtcca
 agtagtatct gacaaagaaa
 gatcatcgac gcagtcacg
 agattcgggt acttccacag
 gggtaaaccg ctcccagccg
 tgaaacaaag gcgtggttta
 ccggtatgag gtagacaata
 caaaagagca ttccaagcca
 gtcagcatag tacatttcat
 tctcacgtga gcatgcagga
 caaaagagca ttccaagcca
 gtcagcatag tacatttcat
 accatgaccg agtacaagcc
 gtacgcaccc tcgccgccgc
 gaccgccaca tcgagcgggt
 gacatcggca aggtgtgggt
 gagagcgtcg aagcgggggc
 ggttcccggc tggccgcgca

6960 cactactcga cttgatcgag tgcgcctttg gagaaatatic
 7020 gtactcgttt taaattcggg gcgatgatga aatccggaat
 7080 acacagtttt gaatgtcgtt atcgccagca gactactaga
 7140 gatgtgcagc gttcattggc gacgacaaca tcatacatgg
 7200 tggctgagag gtgcgccacc tggctcaaca tggaggttaa
 7260 gtgagagacc acctacttc tgcggcggat ttatcttgca
 7320 cgtgccgcgt ggccgatccc ctgaaaaggc tgtttaagtt
 7380 acgacgagca agacgaagac agaagacgcg ctctgctaga
 7440 gagtaggtat aacaggcact ttagcagtgg ccgtgacgac
 7500 ttacacctgt cctactggca ttgagaactt ttgcccagag
 7560 tcagagggga aataaagcat ctctacggtg gtcctaaata
 7620 ctgactaata ccacaacacc accacctcta gacgcgtaga
 7680 ttacacctgt cctactggca ttgagaactt ttgcccagag
 7740 tcagagggga aataaagcat ctctacggtg gtcctaaata
 7800 ctgactaata ctacaacacc accacctcta gctagagctt
 7860 cacggtgcgc ctgccaccc gcgacgacgt cccccgggcc
 7920 gttcgccgac taccgccca cgcgccacac cgtcgaccgc
 7980 caccgagctg caagaactct tcctcacgcg cgtcgggctc
 8040 cgcggacgac ggccgccggg tggcgggtctg gaccacgccg
 8100 ggtgttcgcc gagatcggcc cgcgcatggc cgagttgagc
 8160 gcaacagatg gaaggcctcc tggcgccgca ccggcccaag

gagcccgct ggttcctggc

ggcagcgccg tcgtgctccc

ctggagacct ccgcgccccg

gccgacgtcg agtgcccgaa

tgacgccccg cccacgaccc

tagaccatgg ggtaccgagc

ttttgcttgc agcatgatgc

gcaaaactcg atgtacttcc

atccccgctt accgcgggca

gcagtgcata atgctgcgca

gacgccaaaa actcaatgta

cataactttt attatttctt

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa

tcgaggggaa ttaattcttg

gcggaacccc tatttgttta

aataaccctg ataatgctt

ccaaggcgtc gaaccactga

caccactgtt gctaccccc

tcggccttcg ctgagaggga

acgtatacga gtgccttttc

ccgggcccgtc gaccaattct

8220 caccgtcggc gtctcgcccc accaccaggg caagggtctg

8280 cggagtggag gcggccgagc gcgccgggggt gcccgcttc

8340 caacctcccc ttctacgagc ggctcggctt caccgtcacc

8400 ggaccgcgcg acctggtgca tgaccgcgaa gcccggtgcc

8460 gcagcgcccc accgaaagga gcgcacgacc ccatgatcgc

8520 tcgaattcgc ctctcgcta ttaattatag gacttatgat

8580 tgactagcac acgaagatga cgggcccaat gatccgacca

8640 gaggaactga tgtgcataat gcatcaggct ggtacattag

8700 atatagcaac actaaaaact cgatgtactt ccgaggaagc

8760 gtgttgccac ataaccacta tattaacat ttatctagcg

8820 tttctgagga agcgtggtgc ataatgccac gcagcgtctg

8880 ttattaatca acaaaatttt gttttaaca tttcaaaaaa

8940 aaaaaaaaaa agggaattcc tcgattaatt aagcgccgc

9000 aagacgaaag ggccagggtg cacttttcgg ggaaatgtgc

9060 tttttctaaa tacattcaaa tatgtatccg ctcatgagac

9120 caataatccc tcgtccacgt ggcatctcga gaccttatt

9180 cgactaccct gtactcaggc ctaagccat ccaacgaact

9240 tcattatgct agtcctacta agggcatggc tagcctcttt

9300 ttgtttccct aggcctaatt attattttta attgcccaat

9360 taattctcgt atactatagt ggtcgtatt atctagccgc

9420 catgtttgac agcttatcat cgaatttctg ccattcatcc

gcttattatc acttattcag	9480 gcgtagcaac caggcgttta agggcaccaa taactgcctt
aaaaaaatta cgccccgccc	9540 tgccactcat cgcagtactg ttgtaattca ttaagcattc
tgccgacatg gaagccatca	9600 caaacggcat gatgaacctg aatcgccagc ggcacagca
ccttgtcgcc ttgcgtataa	9660 tatttgccca tggtagaaaac gggggcgaag aagttgtcca
tattggccac gttaaataca	9720 aaactgggtga aactcaccca gggattggct gagacgaaaa
acatattctc aataaacctt	9780 ttagggaaat aggccagggt ttcaccgtaa cacgccacat
cttgcaata tatgtgtaga	9840 aactgccgga aatcgctcgtg gtattcactc cagagcgatg
aaaacgtttc agtttgctca	9900 tggaaaacgg tgtaacaagg gtgaacacta tcccatatca
ccagctcacc gtctttcatt	9960 gccatacgga attccggatg agcattcatc aggcggggcaa
gaatgtgaat aaaggccgga	10020 taaaacttgt gcttattttt ctttacggtc tttaaaaagg
ccgtaatatc cagctgaacg	10080 gtctggttat aggtacattg agcaactgac tgaaatgcct
caaaatgttc tttacgatgc	10140 cattgggata tatcaacggg ggtatatcca gtgatttttt
tctccatttt agcttcctta	10200 gctcctgaaa atctcgataa ctcaaaaaat acgccccgta
gtgatcttat ttcattatgg	10260 tgaaagttag aacctcttac gtgccgatca acgtctcatt
ttcgccaaaa gttaggccag	10320 ggcttcccgg tatcaacagg gacaccagga tttatttatt
ctgcgaagtg atcttccgtc	10380 acaggatatt attcgcgata agctcatgga gcggcgtaac
cgtcgcacag gaaggacaga	10440 gaaagcgagg atctgggaag tgacggacag aacggtcagg
acctggattg gggaggcggt	10500 tgccgccgct gctgctgacg gtgtgacgtt ctctgttccg
gtcacaccac atacgttccg	10560 ccattcctat gcgatgcaca tgctgtatgc cggatataccg
ctgaaagttc tgcaaagcct	10620 gatgggacat aagtccatca gttcaacgga agtctacag
aaggtttttg cgctggatgt	10680 ggctgcccgg caccgggtgc agtttgcgat gccggagtct

gatgcggttg cgatgctgaa

aatgtggaac tgagtggata

cactgagaag cgaacgaaac

taatctcagg agcctgtgta

cggtaacgaa aacgatttga

cggtgaagtg gagcggatta

tgatgtggtc tgccttttta

ccctcgagtg agcgaggaag

gcctgaaaaa acttccttg

ttttttatag tttttagatc

ttctagagaa ggtgttgtga

agtcctgtct gtgacaaatt

tttttcacaa agttatccct

cttgtcacac ttcacatgga

gtaaaaatag cccgcgaatc

cccgggatca aaaacgtatg

ccctacagga acatgacggt

gattgacctc tgcggaagcc

aggaagtggg tttttatcgc

ttccttgggt tatcaaactg

accatatact cattcccttc

10740 acaattatcc tgagaataaa tgccttggcc tttatatgga

10800 tgctgttttt gtctgttaaa cagagaagct ggctgttatc

10860 agtcgggaaa atctcccatt atcgtagaga tccgcattat

10920 gcgtttatag gaagtagtgt tctgtcatga tgcctgcaag

10980 atatgccttc aggaacaata gaaatcttcg tgcggtgtta

11040 tgtcagcaat ggacagaaca acctaataaa cacagaacca

11100 cagccagtag tgctcgccgc agtcgagcga cagggcgaag

11160 caccaggga cagcacttat atattctgct tacacacgat

11220 gggttatcca cttatccacg gggatatttt tataattatt

11280 ttctttttta gagcgccttg taggccttta tccatgctgg

11340 caaattgccc tttcagtgtg acaaatcacc ctcaaatgac

11400 gcccttaacc ctgtgacaaa ttgccctcag aagaagctgt

11460 gcttattgac tcttttttat ttagtgtgac aatctaaaaa

11520 tctgtcatgg cggaacagc ggttatcaat cacaagaaac

11580 gtccagtcaa acgacctcac tgaggcggca tatagtctct

11640 ctgtatctgt tcgttgacca gatcagaaaa tctgatggca

11700 atctgcgaga tccatgttgc taaatatgct gaaatatcgc

11760 agtaaggata tacggcaggc attgaagagt ttcgcgggga

11820 cctgaagagg atgccggcga tgaaaaaggc tatgaatctt

11880 gcgcacagtc catccagagg gctttacagt gtacatatca

11940 tttatcgggt tacagaaccg gtttacgcag tttcggctta

gtgaaacaaa agaaatcacc	12000 aatccgtatg ccatgcgttt atacgaatcc ctgtgtcagt
atcgtaagcc ggatggctca	12060 ggcacgtctt ctctgaaaat cgactggatc atagagcgtt
accagctgcc tcaaagttac	12120 cagcgtatgc ctgacttccg ccgccgcttc ctgcaggtct
gtgttaatga gatcaacagc	12180 agaactccaa tgcgcctctc atacattgag aaaaagaaag
gccgccagac gactcatatc	12240 gtattttcct tccgcgatat cacttccatg acgacaggat
agtctgaggg ttatctgtca	12300 cagatttgag ggtgggttcgt cacatttggt ctgacctact
gagggttaatt tgtcacagtt	12360 ttgctgtttc cttcagcctg catggatttt ctcatacttt
ttgaactgta atttttaagg	12420 aagccaaatt tgagggcagt ttgtcacagt tgatttcctt
ctctttccct tcgtcatgtg	12480 acctgatatc ggggggttagt tcgtcatcat tgatgagggt
tgattatcac agtttattac	12540 tctgaattgg ctatccgcgt gtgtacctct acctggagtt
ttcccacagg tggatatttc	12600 ttcttgcgct gagcgtaaga gctatctgac agaacagttc
ttctttgctt cctcgccagt	12660 tcgctcgcta tgctcggtta cacggctgcg gcgagcgcta
gtgataataa gtgactgagg	12720 tatgtgctct tcttatctcc tttttagtg ttgctcttat
tttaacaac ttgcggttt	12780 tttgatgact ttgcgatttt gttgttgctt tgcagtaa
tgcaagattt aataaaaaaa	12840 cgcaaagcaa tgattaaagg atgttcagaa tgaaactcat
ggaaacactt aaccagtgc	12900 taaacgtgg tcatgaaatg acgaaggcta tcgccattgc
acagtttaat gatgacagcc	12960 cggaagcgag gaaaataacc cggcgctgga gaataggtga
agcagcggat ttagttgggg	13020 tttcttctca ggctatcaga gatgccgaga aagcagggcg
actaccgcac ccggatatgg	13080 aaattcgagg acgggttgag caacgtgttg gttatacaat
tgaacaaatt aatcatatgc	13140 gtgatgtgtt tggtagcgga ttgacgctg ctgaagacgt
atttccaccg gtgatcgggg	13200 ttgctgcca taaaggtggc gttacaaaa cctcagtttc

tggtcatctt gctcaggatc	13260 tggctctgaa ggggctacgt gttttgctcg tggaaggtaa
cgacccccag ggaacagcct	13320 caatgtatca cggatgggta ccagatcttc atattcatgc
agaagacact ctctgcctt	13380 tctatcttgg ggaaaaggac gatgtcactt atgcaataaa
gccacttgc tggccggggc	13440 ttgacattat tccttcctgt ctggctctgc accgtattga
aactgagtta atgggcaa	13500 ttgatgaagg taaactgcc accgatccac acctgatgct
ccgactggcc attgaaactg	13560 ttgctcatga ctatgatgtc atagttattg acagcgcgcc
taacctgggt atcggcacga	13620 ttaatgtcgt atgtgctgct gatgtgctga ttgttccac
gcctgctgag ttgtttgact	13680 acacctccgc actgcagttt ttcgatatgc ttcgtgatct
gctcaagaac gttgatctta	13740 aagggttcga gcctgatgta cgtattttgc ttaccaata
cagcaatagt aatggctctc	13800 agtccccgtg gatggaggag caaatcggg atgcctgggg
aagcatggtt ctaaaaaatg	13860 ttgtacgtga aacggatgaa gttggtaaag gtcagatccg
gatgagaact gtttttgaac	13920 aggccattga tcaacgtctt tcaactgggtg cctggagaaa
tgctctttct atttgggaac	13980 ctgtctgcaa tgaaattttc gatcgtctga ttaaaccacg
ctgggagatt agataatgaa	14040 gcgtgcgctt gttattccaa aacatacgct caatactcaa
ccggttgaag atacttcgtt	14100 atcgacacca gctgccccga tgggtggattc gtttaattgcg
cgcgtaggag taatggctcg	14160 cggtaatgcc attactttgc ctgtatgtgg tcgggatgtg
aagtttactc ttgaagtgct	14220 ccggggtgat agtggtgaga agacctctcg ggtatggtca
ggtaatgaac gtgaccagga	14280 gctgcttact gaggacgcac tggatgatct catcccttct
tttctactga ctgggtcaaca	14340 gacaccggcg ttcggtcgaa gagtatctgg tgtcatagaa
attgccgatg ggagtcgccg	14400 tcgtaaagct gctgcactta ccgaaagtga ttatcgtgtt
ctggttggcg agctggatga	14460 tgagcagatg gctgcattat ccagattggg taacgattat

cgcccaacaa gtgcttatga	14520 acgtggtcag cgttatgcaa gccgattgca gaatgaattt
gctggaaata tttctgcgct	14580 ggctgatgcg gaaaatattt cacgtaagat tattaccgcg
tgtatcaaca ccgccaaatt	14640 gcctaaatca gttgttgctc ttttttctca ccccggtgaa
ctatctgccc ggtcaggtga	14700 tgcacttcaa aaagccttta cagataaaga ggaattactt
aagcagcagg catctaacct	14760 tcatgagcag aaaaaagctg gggtgatatt tgaagctgaa
gaagttatca ctcttttaac	14820 ttctgtgctt aaaacgtcat ctgcatcaag aactagttaa
agctcacgac atcagtttgc	14880 tcctggagcg acagtattgt ataagggcga taaaatgggtg
cttaacctgg acaggtctcg	14940 tgttccaact gagtgtatag agaaaattga ggccattctt
aaggaacttg aaaagccagc	15000 accctgatgc gaccacgttt tagtctacgt ttatctgtct
ttacttaatg tcctttgtta	15060 caggccagaa agcataactg gcctgaatat tctctctggg
cccactgttc cacttgtatc	15120 gtcggtctga taatcagact gggaccacgg tcccactcgt
atcgtcggtc tgattattag	15180 tctgggacca cgggccact cgtatcgctg gtctgattat
tagtctggga ccacgggtccc	15240 actcgatatcg tcggtctgat aatcagactg ggaccacggt
cccactcgta tcgtcgggtct	15300 gattattagt ctgggacat ggtccactc gtatcgctcg
tctgattatt agtctgggac	15360 cacgggtccca ctcgtatcgt cggctctgatt attagtctgg
aaccacggtc ccactcgtat	15420 cgtcggtctg attattagtc tgggaccacg gtcccactcg
tatcgtcggt ctgattatta	15480 gtctgggacc acgatccac tcgtgttgctc ggtctgatta
tcggtctggg accacgggtcc	15540 cacttgtatt gtcgatcaga ctatcagcgt gagactacga
ttccatcaat gcctgtcaag	15600 ggcaagtatt gacatgtcgt cgtaacctgt agaacggagt
aacctcgggtg tgcggttgta	15660 tgcctgctgt ggattgctgc tgtgtcctgc ttatccacaa
cattttgcgc acggttatgt	15720 ggacaaaata cctggttacc caggccgtgc cggcacgtta

```

accgggctgc atccgatgca      15780 agtgtgtcgc tgtcgacgag ctcgcgagct cggacatgag
gttgccccgt attcagtgtc      15840 gctgatttgt attgtctgaa gttgttttta cgtaaagttg
atgcagatca attaatacga      15900 tacctgcgtc ataattgatt atttgacgtg gtttgatggc
ctccacgcac gttgtgatat      15960 gtagatgata atcattatca ctttacgggt ctttccgggt
gatccgacag gttacggggc      16020 ggcgacctcg cgggttttcg ctatttatga aaattttccg
gtttaaggcg tttccgttct      16080 tcttcgtcat aacttaatgt tttatttaa aataccctct
gaaaagaaag gaaacgacag      16140 gtgctgaaag cgagcttttt ggcctctgtc gtttcctttc
tctgtttttg tccgtggaat      16200 gaacaatgga agtccgagct catcgctaata aacttcgtat
agcatacatt atacgaagtt      16260 atattcgatg cggccgctga ggtctgcctc gtgaagaagg
tggtgctgac tcataccagg      16320 gctgaatcgc cccatcatcc agccagaaag tgaggggagcc
acggttgatg agagctttgt      16380 tgtaggtgga ccagttgggtg atttgaact tttgctttgc
cacggaacgg tctgcgttgt      16440 cgggaagatg cgtgatctga tccttcaact cagcaaaagt
tcgatttatt caacaaagcc      16500 acgtgtctca aaatctctga tgttacattg cacaagataa
aatatatca tcatgaacaa      16560 taaaactgtc tgcttacata aacagtaata caaggggtgt
tatgagccat attcaacggg      16620 aaacgtcttg ctcgacgatg ataagctgtc aaacatgaga
attgggtcgt caatatgcta      16680 aaacgcggca taccgccgt attcccacta gtttaattaac
ctgcaggggg ctgttagagg      16740 tcttccctag tccaactata gcgtatggac atattgtcgt
tagaacgcgg ctacaattaa      16800 tacataacct tatgtatcat acacatacga ttagggggac actatag
16847 <210>      43 <211>      18563 <212>      DNA <213>      Artificial Sequence <220> <
223>      sequence for pBACSP6/JVFL/XhoI <400>      43 agaagtttat ctgtgtgaac ttcttgctt
agtatcgttg agaagaatcg agagattagt      60 gcagttttaa cagtttttta gaacggaaga

```

taaccatgac taaaaaacca ggagggcccg
 gcggcctacc ccgcgtattc ccactagtgg
 acggcagagg accagtacgt ttcgtgctgg
 tagccccgac caaggcgctt ttaggccgat
 aacatcttac tagtttcaaa cgagaacttg
 gcagaaagca aaacaaaaga ggaggaaatg
 cagttgtcat agcttgtgta ggagccatga
 tgaccattaa caacacggac attgcagacg
 acagatgctg ggtccgggca atcgatgtcg
 aatgtcctaa gcttaccatg ggcaatgac
 aagaagtcta cgtccaatat ggacggtgca
 ggtccgtgtc ggtccaaaca catggggaga
 tggattcaac gaaagccaca cgatatctca
 ctggctatgc tttcctggcg gcggtacttg
 gcgtggtgtt taccatcttc ctgctgttgg
 gaatgggcaa ccgtgacttc atagaaggag
 tagaaggaga tagctgcttg acaatcatgg
 tgattaacat cgaagccagc caacttgctg
 tcactgacat ctcgacggtg gctcggtgcc
 gagctgatag tagctatgtg tgcaaacaag
 gtggactttt cgggaaggga agcattgaca

120 gtaaaaaccg ggctatcaat atgctgaaac
 180 gagtgaagag ggtagtaatg agcttgttgg
 240 ctcttatcac gttcttcaag tttacagcat
 300 ggaaagcagt ggaaaagagt gtggcaatga
 360 gaacactcat tgacgccgtg aacaagcggg
 420 aaggctcaat catgtggctc gcgagtttgg
 480 agttgtcaaa tttccaaggg aagcttttga
 540 tcatcgtgat tcctacctca aaaggagaga
 600 gctacatgtg tgaggacact atcacgtacg
 660 cagaggatgt ggattgctgg tgtgacaacc
 720 cgcgaccag gcattccaag cgaagcagga
 780 gttcactagt gaataaaaaa gaggcttggc
 840 tgaaaactga gaactggatc ataaggaatc
 900 gctggatgct tggcagtaac aatggtcaac
 960 tcgctccggc ttacagtttt aattgtctgg
 1020 ccagtggagc cacttgggtg gacttagtgc
 1080 caaacgacaa accaacattg gacgtccgca
 1140 aggtcagaag ctactgctat catgcttcag
 1200 ccacgactgg agaagccac aacgagaagc
 1260 gtttactga tcgtgggtgg ggcaacggat
 1320 catgtgcaaa attctcctgc accagtaagg

cgattgggag aacaatccag ccagaaaaca
gaaccaccac ctcggaaaac catgggaatt
caaagtttac agtaacaccc aatgctcctt
aagtcacact ggactgtgaa ccaaggagtg
ccgtgggggtc aaagtcattt ctggtccata
ggacgtcccc ttcgagcaca gcgtggagaa
cgcacgccac aaaacagtcc gttgttgctc
cgctggcagg agccatcgtg gtggagtact
tgaaatgtag gctgaaaatg gacaaactgg
cagaaaaatt ctcgttcgcg aaaaatccgg
aactctccta ttctgggagt gatggcccct
tcaatgacat gacccccgtt gggcggctgg
gtgccaactc aaaggtgctg gtcgagatgg
ttggaagggg agacaagcag atcaaccacc
aggctttttc aacaactttg aaggagctc
gggactttgg ctctattgga ggggtcttca
ttggtggcgc tticagaaca ctctttgggg
gtgccctact actctggatg ggcatcaacg
tggccacagg aggtgtgctc gtgttcttag
ccattgacat cgcaagaaaa gagatgagat
tggaagcctg ggtggatagg tataaatatt

1380 tcaaatacga agttggcatt tttgtgcatg
1440 attcagcgca agtaggggcg tcccaggcgg
1500 cgataaccct caaacttggg gactacggag
1560 gactgaacac tgaagcgttt tacgtcatga
1620 gggaatgggt tcatgacctc gctctcccct
1680 acagagaact cctcatggaa tttgaagagg
1740 ttgggtcaca ggaaggaggc ctccatcagg
1800 caagctcagt gaagttaaca tcaggccacc
1860 ctctgaaagg cacaacctat ggcatgtgta
1920 cggacactgg ccacggaaca gttgtcattg
1980 gcaaaattcc gattgtctcc gttgcgagcc
2040 tgacagtga ccccttcgtc gcgacttcca
2100 aacccccctt cggagactcc tacatcgtag
2160 attggcataa agctggaagc acgctgggca
2220 aaagactggc agcgttgggc gacacagcct
2280 actccatagg aaaggccgtt caccaagtgt
2340 gaatgtcttg gatcacacaa gggttaatgg
2400 cacgagatcg atcaattgct ttggccttct
2460 cgaccaatgt gcatgctgac actggatgtg
2520 gcggaagtgg catcttcgtg cacaacgacg
2580 tgccagaaac gcccatcc ctagcgaaga

tcgtccacaa agcgcacaa gaaggcgtgt
accaaattgt ggaagccgtg cgggacgaat
acctcagtgt ggttgtgaac aagcccgtgg
ccatgacgca agagaagttt gaaatgggct
ccccggaatt ggctaactcc acatttgttg
atgagcacag agcctggaac agcatgcaaa
cccgtgtgtg gctgaagatt agagaggaaa
gcacagctgt caaaggacat gtggcagttc
gctacaacga cacatggaaa cttgagaggg
ggccagagac acacactctt tggggagatg
ataccatagc cggaccaaaa agcaagcaca
agggaccttg ggacgaaaac ggcatagtct
tcaccatcac agaggattgt ggcaagagag
gaaagttgat tactgactgg tgctgtcgca
cagaaaatgg ctgctgggtac ggaatggaaa
tcgtcagatc acaggttgat gctttcaatg
ttctggatgat gtttctggcc acccaggagg
ccattcctgc ggttttgggg gccctgcttg
atttggcgag gtatgtggtg ctagtcgctg
acgtcctgca ctttgctttg attgccgttt
acatgcttag cacgagatgg acgaaccaag

2640 gcggagtcag atctgtcact agactggagc
2700 tgaacgtcct gctcaaagag aatgcagtgg
2760 ggagatatcg ctacagcccca aaacgcctgt
2820 ggaaagcatg gggaaaaagc attctctttg
2880 tagatggacc tgagacaaaag gaatgtcctg
2940 tcgaagactt cggcttttgt atcacatcaa
3000 gcactgacga gtgtgatgga gcgatcatag
3060 atagtactt gtcgtactgg attgagagtc
3120 cagtctttgg agaggtcaaa tcttgactt
3180 gtgttgagga aagtgaactc atcatccgc
3240 atcggaggga aggttataaa acacaaaacc
3300 tggactttga ttattgccca gggacaaaag
3360 gcccttcggt cagaaccact actgacagtg
3420 gttgctccct tccgcccta cgattccgga
3480 tcagacctgt taggcatgat gaaacaacac
3540 gtgaaatggt tgaccctttt cagctgggcc
3600 tccttcgcaa gaggtggacg gccagattga
3660 tgctgatgct tgggggcatc acttacactg
3720 ctgctttcgc agaggccaat aatggaggag
3780 ttaagatcca accagctttt ctagtgatga
3840 aaaacgtggt cctggctcta ggggctgcct

tctttcaatt ggcctcagta gatctgcaaa
ctatagcatg gatgattgtt cgagcgatca
cagtcttagc gcttctaact ccgggaatga
tccttctcgt catagggatt tgctccctgc
agaaaggagc tgtactcttg ggcttagcgc
ccatagctgc tggactaatg gtctgcaacc
agtttctgtc ggcagtcgga ttgatgtttg
ttgaatccat gtcaataccc ttcatgctgg
caggaaaagc aacagatatg tggctcgaac
ctgcaatcac aggaagcagt cggaggctgg
acttgattga tgatcccggc gttccatgga
gcttagccgc cctcacgcct tgggccattg
taaaaacaac aaaaagaggg ggcgtgtttt
aaggagacac cactacagga gtctaccgaa
aggctggcgt cggagtcatg tacgagaatg
gggcagccat tatgagtgga gaaggaaaat
accgcatagc ttacggaggc ccatggagat
tgcaagtgat cgtggtagaa ccggggaagg
tgtttcggac ccccttcggg gaggttgggg
ccggctcacc cattctggat tccaatggag
agcttggcga tggctcatc gtcagcgcca

3900 tcggagtcca cggaatcctg aatgccgccg
3960 ccttccccac aacctcctcc gtcacatgc
4020 gggctctata cctagacact tacagaatca
4080 tgcaagagag gaaaaagacc atggcaaaaa
4140 tcacatccac tggatggttc tcgcccacca
4200 caaacaagaa gagagggtgg ccagctactg
4260 ccatcgtagg tggtttggcc gatttggata
4320 caggctttat ggcagtgctc tacgtagtgt
4380 gggccgccga catcagctgg gagatggatg
4440 atgtgaaact ggatgatgac ggagattttc
4500 aagtttgggt cttgcgcatg tcttgcattg
4560 ttcccgccgc ttccggttac tggctcactt
4620 gggacacgcc atccccgaaa ctttgcttaa
4680 tcatggctag agggattctt ggcacctacc
4740 ttttccacac actatggcac acaactagag
4800 tgacgccata ctggggtagc gtgaaagaag
4860 ttgatcgaaa atggaatgga acagatgacg
4920 ctgcggtaaa catccagaca aaaccaggag
4980 ctgttagcct ggattacccg cgaggaacat
5040 acatcatagg cctatacggc aatggagtig
5100 tcgtgcaggg tgaccgtcag gaggaaccag

tcccagaagc ttacactcca aacatgttaa
accctggttc agggaaaacc aggaaaattc
agcgcctaag aacagctgtg ttggcaccga
ctttgagagg gctcccagta cgataccaaa
atgaaatagt ggatgtgatg tgccacgcca
gagtgcccaa ctacaatctg tttgtcatgg
tagccgcacg aggatacatc gctaccaagg
tgacagcgac cccgcctgga accacggatc
atttacaaga tgagatacca gacagggcat
atgcgggtaa aaccgtgtgg tttgtggcga
gcctccaaag agcgggaaaa aaggtcatcc
accctaaatg taagaatgga gactgggatt
gggctaactt cggtgcgagc agggtcacg
tagaagaggg agaaggcaga gtcacctcg
cagctcaacg gaggggcaga gtaggcagaa
atggaggggc taccagtga gtagacagta
tgttagacaa catacacatg cccaatgggc
aaaaggcttt cacaatggat ggcgaatacc
tagagctgct taggacggct gaccttccgg
gcattcagta caccgacaga aagtgggtt
aggacaacac cgaggtagag atagtcaccc

5160 gaaagagaca gatgactgtg ttagatttgc
5220 tgccacaaat aattaaggat gcaatccagc
5280 cgcggtgtgt agcagcagaa atggcagaag
5340 cttcagcagt gcagagagag caccaaggga
5400 ctctgacca cagattgatg tcaccgaaca
5460 atgaagctca tttcaccgac ccagccagca
5520 tggaattagg agaggcagca gccatcttta
5580 cttttcccga ctcaatgcc ccaatccatg
5640 ggagcagtgg atacgaatgg atcacagaat
5700 gcgtaaaaat ggggaatgag attgcaatgt
5760 aactcaaccg caagtcctat gacacagaat
5820 ttgtcattac caccgacatc tctgaaatgg
5880 actgcagaaa gagcgtgaaa cccaccatct
5940 gaaacccatc tcccataacc agtgctagcg
6000 accccaacca agttggagat gaataccatt
6060 acctagccca ttggacagag gcaaagatca
6120 tggtagccca gctctatgga ccagagaggg
6180 gtctcagggg tgaagaaaag aaaaacttct
6240 tgtggctggc ctataaggtg gcgtccaatg
6300 ttgatgggcc gcgcacgaat gccatactgg
6360 ggatgggtga gagaaagatc ctcaagccga

gatggcttga tgcaagagta tacgcagatc
cagcaggaaa gagatcggcc gttagcttca
tcatgggaaa gacgcgggaa gctttagaca
gtgggaaggc acaccgaatg gctctcgaag
ttattgttgc catcactgta atgacaggag
gtatagggaa gatgggtctt ggagctctag
cggcagaggt tcctggaacc aaaatagcag
tggtttctcat cccagaaccg gaaaaacaga
ttctcatctg cgtcttgacc gtggttggag
aaaaaaccaa agcagatctc aagagcatgt
ctggattgcc aagcatggca ctggacctgc
ggagcacagt tgtgctaacc cctcttctga
catcgctagc ctcaattaac tcacaagctg
ctttaccga tctagacctg accgttggcc
ccctcacaac gtttttgaca gccatggttc
ctggatggca agcagaagca ctcagggctg
agaatgccgt tgttgacgga atggtcgcca
ctctgatgca aaagaaaagtc ggacaggtgc
tcgtcaaccc taatgtcacc actgtgagag
tcaccttgtg ggataatgga gccagtgccg
gccatgtcat gcgaggtagc tacctggctg

6420 accaagccct caagtgggtc aaagactttg
6480 tagaggtgct cggtcgcatg cctgagcatt
6540 ccatgtactt ggtcgcaacg gctgagaaag
6600 agttgccgga tgcactggaa accatcacac
6660 gattcttcct actaatgatg cagcgaaagg
6720 tgctcacgct agctaccttc ttcctgtggg
6780 ggacctgct gatcgccctg ctgctgatgg
6840 ggtcacagac agacaaccaa ctagcgggtg
6900 tggtagcagc aaacgagtac gggatgctag
6960 ttggcggaaa gacacaggca tcaggactga
7020 gtccagccac agcctgggca ctgtatgggg
7080 agcacctgat cacgtcgga taatgtacca
7140 gctcattatt cgtcttgcca cgaggcgtgc
7200 tcgtcttcct tggctgctgg ggtcaaatca
7260 tggcgacact tcactatggg tacatgctcc
7320 cccagagaag gacggcggct ggaataatga
7380 ctgatgtgcc tgaactggaa aggactactc
7440 tcctcatagg ggtgagcgtg gcagcgttcc
7500 aagcaggggt gttggtgacg gcggctacgc
7560 tttggaattc caccacagcc acgggactct
7620 gaggtcttat tgcttggact cttatcaaga

acgctgacaa gccctccttg aaaaggggaa
ggaaggaaaa actaaatgcc atgagcagag
taatcgaggt ggaccgcact gaagcacgca
gacatccggt ttcgcgaggc tcagcaaaac
cgccaatagg aaaagtcatt gatctagggt
caaccctgaa gaaggtccag gaagtcagag
agccgatgct catgcagagc tacggctgga
tgttctacaa accttcagag cctagtgaca
caagtcaga agtggagaa caacgcacac
tgcatcgagg acccagagag ttctgcataa
tagaaaaaat ggaagtcttg cagcgccgct
ccgaaactc caatcacgag atgtattggg
ctgtgaacat gaccagccag gtactactgg
caaagtatga ggaagatgtc aacctaggta
ttcatagcaa tcaggagaaa atcaagaaga
caacgtggca caaagaccct gaacacccat
aggtgaaggc tactggctca gccagctctc
aaccttggga cgccattgcc aacgtcacca
gacagcaaag agttttcaag gagaaagttg
tcaaggaagt gctcaacgag accaccaact
gaccccgctt gtgcaccaag gaagaattta

7680 ggcctggggg caggacgcta ggggagcagt
7740 aagagttttt taaataccgg agagaggcca
7800 gggctagacg tgaaaataac atagtgggag
7860 tccgttggct cgtggagaaa ggattcgtct
7920 gtgggcgtgg aggatggagc tactacgcag
7980 gatacacgaa aggtggggcg ggacatgaag
8040 acctggtctc cttgaagagt ggagtggatg
8100 ccctgttctg tgacataggg gaatcctccc
8160 tacgcgtcct agagatgaca tccgattggt
8220 aagttctctg cccttacctg cccaaggtca
8280 tcggaggtgg gctagtagct ctccccctgt
8340 ttagtggagc cgctggcaat gtggtgcacg
8400 ggcgaatgga tcgcacagtg tggagagggc
8460 gcggaacaag agccgtggga aagggagaag
8520 gaatccagaa gcttaaagaa gaattcgcca
8580 accgcacttg gacataccac ggaagctatg
8640 tcgtcaacgg agtggatgaag ctcatgagta
8700 ccatggccat gactgacacc accccttttg
8760 acacgaaagc tcctgagcca ccagctggag
8820 ggctgtgggc ccacttgtca cgggaaaaaa
8880 taaagaaagt caatagcaac gcggctcttg

gagcagtgtt tgctgaacag aatcaatgga
ggttttggga gatggtcaat gaagagaggg
gtatctacaa catgatggga aaaagagaga
ggagcagggc catttggttc atgtggcttg
ggttcctgaa tgaagaccac tggctgagcc
caggcgtcca aaagttggga tacatcctcc
tgtacgctga tgacaccgcc ggggtgggaca
aagctaaggt gctggagctc ctagatggtg
aactgactta caggcacaaa gtggtcaagg
tgatggacgt gatatcaaga gaagacccaaa
tcaacacttt cacgaacatc gctgtccagc
ttgggccaca acaacttgga cagctgccta
tctttgagaa tggagaggag agagtgacca
tcaagccgct ggacgacaga ttcgccacgg
ttagaaaaga catccaggaa tggaagcctt
ccttctgctc taaccacttt caggagattg
cgtgcagagg acaggatgag ctgataggca
atgtgaagga cacagcttgc ctggcaaaag
tccatcgtag ggacctgcgt ctcattggcaa
gggtgcccac aggcaggaca tcctgtgtaa
aagacatgct gcaggctctg aacagagtct

8940 gcacggcgcg tgaggctgtg gacgacccgc
9000 aaaaccatct gcgaggagag tgtcacacat
9060 agaagcctgg agagtttgga aaagctaaag
9120 gagcacggta tctagagttt gaagctttgg
9180 gagagaattc aggaggtgga gtagaaggct
9240 gtgacatagc aggaaagcaa ggagggaana
9300 ctagaattac tagaactgat ttagaaaatg
9360 aacaccgcat gctcgcccgg gccataattg
9420 tcatgagacc tgcagcagaa ggaaagaccg
9480 gggggagtgg acagggtggtc acttatgctc
9540 tcgttaggct gatggaggct gaggggggtca
9600 ggaaaaacaa gatagctgtc aggacttggc
9660 ggatggcgat cagcggagac gactgtgtcg
9720 ccctccattt cctcaacgca atgtcaaagg
9780 cgcacggctg gcacgattgg cagcaagttc
9840 tgatgaaaga cggaaggagt atagttgtcc
9900 gggctcgcat ctctccagga gctggatgga
9960 catatgcaca gatgtggcta ctctataact
10020 atgcgatttg ctacagcagt ccagtggatt
10080 tacactcgaa aggagagtgg atgaccacgg
10140 ggattgaaga aatgaatgg atgatggata

agactcccgt cacaagctgg acagacgttc
gtggcagcct catcggaacg cgttccagag
taaaccaggt tagagctgtc attgggaaag
ggagatacga agacgtcttg atccaggaag
aatgtaaata atgtgaatga gaaaatgcat
accggatact gggtagacgg tgctgcctgc
atctgacaac agaaagttag aaagccctca
tggaagtiga aagaccaacg tcaggccacg
ctgcgagccc ccaggaggac tgggttacca
cgtctaggat gcaatagacg aggtgtaagg
aacaacatgc ggcccaagcc ccctcgaagc
aggagacccc gcatttgcac caaacagcat
tctgctctat ctcaacatca gctactaggc
aggaagaaca caggatctcg agcggccgcg
agagggattt gttccctagg cctaattatt
ccttttctaa ttctcgtata ctatagttag
caattctcat gtttgacagc ttatcatcga
tattcaggcg tagcaaccag gcgtttaagg
cccgccctgc cactcatcgc agtactgttg
gccatcacia acggcatgat gaacctgaat
cgtataatat ttgcccatgg tgaaaacggg

10200 cgtatgtggg aaagcgtgag gacatctggt
10260 caacctgggc tgagaacatc tatgcggcga
10320 aaaattatgt tgactacatg acctcactca
10380 acagggtcat ctagtgtgac ttaaggtaga
10440 gtatatggag tcaggccagc aaaagctgcc
10500 gtctcagtcc caggaggact gggtaacaa
10560 gaaccgtctc ggaagtaggt ccctgctcac
10620 aatttgtgcc actccgctgg ggagtgcggc
10680 aagccgttga ggccccacg gcccaagcct
10740 actagagggt agaggagacc ccgtggaaac
10800 ttagaggag gtggaaggac tagaggttag
10860 attgacacct gggaatagac tgggagatct
10920 acagagcgcc gaagtatgta gctggtggtg
10980 gaccgactag cctcttttcg gccttcgctg
11040 atttttaatt gcccaatagc tatacagagt
11100 tcgtattatc tagccgcccg ggccgtcgac
11160 atttctgcca ttcatccgct tattatcact
11220 gcaccaataa ctgccttaaa aaaattacgc
11280 taattcatta agcattctgc cgacatggaa
11340 cgccagcggc atcagcacct tgtcgcttg
11400 ggcaagaag ttgtccatat tggccacgtt

taaatcaaaa ctggtgaaac tcacccaggg
aaacccttta gggaaatagg ccaggttttc
gtgtagaaac tgccggaaat cgtcgtggta
ttgctcatgg aaaacggtgt aacaagggtg
tttcattgcc atacggaatt ccgatgagc
ggccggataa aacttgtgct tatttttctt
ctgaacggtc tggttatagg tacattgagc
acgatgccat tgggatatat caacggtggt
ttccttagct cctgaaaatc tcgataactc
attatggtga aagttggaac ctcttacgtg
ggcccagggc ttcccggat caacagggac
ttccgtcaca ggtatttatt cgcgataagc
ggacagagaa agcgcggatc tgggaagtga
aggcggttgc cgccgctgct gctgacggtg
cgttccgcca ttcctatgcg atgcacatgc
aaagcctgat gggacataag tccatcagtt
tggatgtggc tgcccggcac cgggtgcagt
tgctgaaaca attatcctga gaataaatgc
gtggatatgc tgtttttgtc tgttaaacag
acgaaacagt cgggaaaatc tcccattatc
ctgtgtagcg tttataggaa gtagtgttct

11460 attggctgag acgaaaaaca tatttctaat
11520 accgtaacac gccacatctt gcgaatatat
11580 ttcactccag agcgatgaaa acgtttcagt
11640 aacactatcc catatcacca gtcaccgtc
11700 attcatcagg cgggcaagaa tgtgaataaa
11760 tacggtcttt aaaaaggccg taatatccag
11820 aactgactga aatgcctcaa aatgttcttt
11880 atatccagtg atttttttct ccattttagc
11940 aaaaaatag cccggtagtg atcttatttc
12000 ccgatcaacg tctcattttc gccaaaagtt
12060 accaggattt atttattctg cgaagtgatc
12120 tcatggagcg gcgtaaccgt cgcacaggaa
12180 cggacagAAC ggtcaggacc tggattgggg
12240 tgacgttctc tgttccggtc acaccacata
12300 tgtatgccgg tataccgctg aaagttctgc
12360 caacggaagt ctacacgaag gtttttgcgc
12420 ttgcgatgcc ggagtctgat gcggttgcga
12480 cttggccttt atatggaaat gtggaactga
12540 agaagctggc tgttatccac tgagaagcga
12600 gtagagatcc gcattaitaa tctcaggagc
12660 gtcatgatgc ctgcaagcgg taacgaaaac

gatttgaata tgccttcagg aacaatagaa
 cggattatgt cagcaatgga cagaacaacc
 ccttttacag ccagtagtgc tgcgcgcagt
 gaggaagcac cagggaacag cacttatata
 tcccttgggg ttatccactt atccacgggg
 ttagatcttc ttttttagag cgcctttag
 gttgtgacaa attgcccttt cagtgtgaca
 acaaattgcc cttaaccctg tgacaaattg
 tatccctgct tattgactct tttttattta
 acatggatct gtcatggcgg aaacagcgg
 gcgaatcgtc cagtcaaacg acctcactga
 acgtatgctg tatctgttcg ttgaccagat
 tgacggtatc tgcgagatcc atgttgctaa
 ggaagccagt aaggatatac ggcaggcatt
 ttatcgccct gaagaggatg ccggcgatga
 caaacgtgcg cacagtccat ccagagggct
 tcccttcttt atcgggttac agaaccgggt
 aatcaccaat ccgtatgcca tgcgtttata
 tggctcaggc atcgtctctc tgaaaaatcga
 aagttaccag cgtatgcctg acttccgccg
 caacagcaga actccaatgc gcctctcata

12720 atcttcgtgc ggtgttacgt tgaagtggag
 12780 taatgaacac agaaccatga tgttgtctgt
 12840 cgagcgacag ggcgaagccc tcgagtgagc
 12900 ttctgcttac acacgatgcc tgaaaaaact
 12960 atatttttat aattattttt tttatagttt
 13020 gcctttatcc atgctgggtc tagagaaggt
 13080 aatcacctc aatgacagt cctgtctgtg
 13140 ccctcagaag aagctgtttt ttcacaaagt
 13200 gtgtgacaat ctaaaaactt gtcacacttc
 13260 tatcaatcac aagaaacgta aaaatagccc
 13320 ggcggcatat agtctctccc gggatcaaaa
 13380 cagaaaatct gatggcacc caccaggaaca
 13440 atatgctgaa atattcggat tgacctctgc
 13500 gaagagtctc gcggggaagg aagtggtttt
 13560 aaaaggctat gaatcttttc cttggtttat
 13620 ttacagtgtg catatcaacc catatctcat
 13680 tacgcagttt cggcttagtg aaacaaaaga
 13740 cgaatccctg tgtcagtatc gtaagccgga
 13800 ctggatcata gagcgttacc agctgcctca
 13860 ccgcttcctg caggtctgtg ttaatgagat
 13920 cattgagaaa aagaaaggcc gccagacgac

tcatatcgta ttttccttcc gcgatatcac
tctgtcacag atttgagggt gggttcgtcac
cacagttttg ctgtttcctt cagcctgcat
tttaaggaag ccaaatttga gggcagtttg
tcatgtgacc tgatatcggg ggtagttcg
ttattactct gaattggcta tccgcgtgtg
atatttcttc ttgcgctgag cgtaagagct
cgccagttcg ctgcctatgc tcggttacac
actgaggtat gtgctcttct tatctccttt
gcggtttttt gatgactttg cgattttgtt
aaaaaacgc aaagcaatga ttaaaggatg
cagtgcataa acgctgggtca tgaaatgacg
gacagcccgg aagcgaggaa aataaccggg
gttggggttt ctctcaggc tatcagagat
gatatggaaa ttcgaggacg ggttgagcaa
catatgcgtg atgtgtttgg tacgcgattg
atcggggttg ctgccataa aggtggcggtt
caggatctgg ctctgaaggg gctacgtgtt
acagcctcaa tgtatcacgg atgggtacca
ctgcctttct atcttgggga aaaggacgat
ccggggcctt acattattcc ttctgtctg

13980 ttccatgacg acaggatagt ctgagggtta
14040 atttgttctg acctactgag ggtaatttgt
14100 ggattttctc atactttttg aactgtaatt
14160 tcacagttga tttccttctc tttcccttcg
14220 tcatcattga tgagggttga ttatcacagt
14280 tacctctacc tggagttttt cccacgggtg
14340 atctgacaga acagttcttc tttgcttctt
14400 ggctgcggcg agcgctagtg ataataagtg
14460 tgtagtggtg ctcttatttt aaacaacttt
14520 gttgctttgc agtaaattgc aagatttaat
14580 ttcagaatga aactcatgga aacacttaac
14640 aaggctatcg ccattgcaca gttaaatgat
14700 cgctggagaa taggtgaagc agcggattta
14760 gccgagaaag cagggcgact accgcacccg
14820 cgtgttggtt atacaattga acaaattaat
14880 cgacgtgctg aagacgtatt tccaccggtg
14940 tacaaaacct cagtttctgt tcatcttgct
15000 ttgctcgtgg aaggtaacga ccccaggga
15060 gatcttcata ttcatgcaga agacactctc
15120 gtcacttatg caataaagcc cacttgctgg
15180 gctctgcacc gtattgaaac tgagttaatg

ggcaaatttg atgaaggtaa actgcccacc
gaaactgttg ctcatgacta tgatgtcata
ggcacgatta atgtcgtatg tgctgctgat
tttgactaca cctccgcact gcagtttttc
gatcttaaag ggttcgagcc tgatgtacgt
ggctctcagt ccccgatggat ggaggagcaa
aaaaatgttg tacgtgaaac ggatgaagtt
tttgaacagg ccattgatca acgctcttca
tgggaacctg tctgcaatga aattttcgat
taatgaagcg tgcgcctggt attccaaaac
cttcgttatc gacaccagct gccccgatgg
tggctcgcgg taatgccatt actttgcctg
aagtgtccg gggatgatag gttagagaaga
accaggagct gcttactgag gacgcactgg
gtcaacagac accggcggtc ggtcgaagag
gtcgccgtcg taaagctgct gcacttacgg
tggatgatga gcagatggct gcattatcca
cttatgaacg tggtcagcgt tatgcaagcc
ctgcgtggc tgatgcggaa aatatttcac
ccaaattgcc taaatcagtt gttgctcttt
caggtgatgc acttcaaaaa gcctttacag

15240 gatccacacc tgatgctccg actggccatt
15300 gttattgaca gcgcgcctaa cctgggtatc
15360 gtgctgattg ttcccacgcc tgctgagttg
15420 gatatgcttc gtgatctgct caagaacgtt
15480 attttgctta ccaaatacag caatagtaat
15540 attcgggatg cctggggaag catggttcta
15600 ggtaaaggtc agatccgat gagaactgtt
15660 actggtgcct ggagaaatgc tctttctatt
15720 cgtctgatta aaccacgtg ggagattaga
15780 atacgtcaa tactcaaccg gttgaagata
15840 tggattcggt aattgcgcgc gtaggagtaa
15900 tatgtggtcg ggatgtgaag ttactcttg
15960 cctctcgggt atggtcaggt aatgaacgtg
16020 atgatctcat cccttctttt ctactgactg
16080 tatctggtgt catagaaatt gccgatggga
16140 aaagtgatta tcgtgttctg gttggcgagc
16200 gattgggtaa cgattatcgc ccaacaagtg
16260 gattgcagaa tgaatttgct ggaaatattt
16320 gtaagattat taccgctgt atcaacaccg
16380 tttctacccc cggatgaacta tctgcccgtt
16440 ataaagagga attacttaag cagcaggcat

ctaaccttca tgagcagaaa aaagctgggg	16500 tgatatattga agctgaagaa gttatcactc
ttttaacttc tgtgcttaaa acgtcatctg	16560 catcaagaac tagtttaagc tcacgacatc
agtttgctcc tggagcgaca gtattgtata	16620 agggcgataa aatgggtgctt aacctggaca
ggtctcgtgt tccaactgag tgtatagaga	16680 aaattgaggc cattcttaag gaacttgaaa
agccagcacc ctgatgcgac cacgttttag	16740 tctacgttta tctgtcttta cttaatgtcc
tttgttacag gccagaaagc ataactggcc	16800 tgaatatctct ctcctgggcc actgttccac
ttgtatcgtc ggtctgataa tcagactggg	16860 accacgggtcc cactcgtatc gtcggtctga
ttattagtct gggaccacgg tcccactcgt	16920 atcgtcggtc tgattattag tctgggacca
cgggtcccact cgtatcgtcg gtctgataat	16980 cagactggga ccacgggtccc actcgtatcg
tcggtctgat tattagtctg ggaccatggt	17040 cccactcgta tcgtcgggtct gattattagt
ctgggaccac ggtcccactc gtatcgtcgg	17100 tctgattatt agtctggaac cacgggtccca
ctcgtatcgt cggctctgatt attagtctgg	17160 gaccacggtc ccaactcgtat cgtcgggtctg
attattagtc tgggaccacg atcccactcg	17220 tgttgtcgggt ctgattatcg gtctgggacc
acgggtcccac ttgtattgtc gatcagacta	17280 tcagcgtgag actacgattc catcaatgcc
tgtcaagggc aagtattgac atgtcgtcgt	17340 aacctgtaga acggagtaac ctcggtgtgc
ggttgatatgc ctgctgtgga ttgctgctgt	17400 gtcctgctta tccacaacat ttgcgcacg
gttatgtgga caaaatacct ggtiaccag	17460 gccgtgccgg cacgttaacc gggctgcatc
cgatgcaagt gtgtcgtgt cgacgagctc	17520 gcgagctcgg acatgagggt gccccgtatt
cagtgtcgt gatttgtatt gtctgaagtt	17580 gtttttacgt taagttgatg cagatcaatt
aatacgatac ctgcgtcata attgattatt	17640 tgacgtgggt tgatggcctc cacgcacgtt
gtgatatgta gatgataatc attatcactt	17700 tacgggtcct ttccggtgat ccgacaggtt

acggggcggc gacctcgcg gttttcgcta
 ccgttcttct tcgtcataac ttaatgtttt
 acgacaggtg ctgaaagcga gctttttggc
 gtggaatgaa caatggaagt ccgagctcat
 cgaagttata ttcgatgcgg cgctgaggtc
 accaggcctg aatcgcccca tcatccagcc
 ctttgttgta ggtggaccag ttggtgat
 cggtgtcggg aagatgcgtg atctgacct
 aaagccacgt gtctcaaaat ctctgatgtt
 gaacaataaa actgtctgct tacataaaca
 aacgggaaac gtcttgctcg acgatgataa
 atgctaaaac gcggcataacc ccgcgtattc
 tagaggtctt ccctagtcca actatagcgt
 aattaataca taaccttatg tatcatacac

17760 tttatgaaaa tttccgggtt taaggcggtt
 17820 tatttaaaat accctctgaa aagaaaggaa
 17880 ctctgtcgtt tcctttctct gttttgtcc
 17940 cgctaataac ttcgtatagc atacattata
 18000 tgcctcgtga agaaggtgtt gctgactcat
 18060 agaaagttag ggagccacgg ttgatgagag
 18120 tgaacttttg ctttgccacg gaacgggtctg
 18180 tcaactcagc aaaagttcga tttattcaac
 18240 acattgcaca agataaaaaat atatcatcat
 18300 gtaatacaag ggggtgttatg agccatattc
 18360 gctgtcaaac atgagaattg ggtcgtcaat
 18420 ccactagtta attaacctgc agggggctgt
 18480 atggacatat tgtcgttaga acgcggctac
 18540 atacgattta ggggacacta tag

18563 <210> 44 <211> 18563 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <
 223> sequence for pBACSP6/JVFLx/XhoI <400> 44 agaagtttat ctgtgtgaac ttcttggtt
 agtatcgttg agaagaatcg agagattagt 60 gcagtttaaa cagtttttta gaacggaaga
 taaccatgac taaaaaacca ggagggcccg 120 gtaaaaaccg ggctatcaat atgctgaaac
 gcggcctacc ccgcgtattc ccactagtgg 180 gagtgaagag ggtagtaatg agcttggttg
 acggcagagg accagtacgt ttcgtgctgg 240 ctcttatcac gttcttcaag tttacagcat
 tagccccgac caaggcgctt ttaggccgat 300 ggaaagcagt ggaaaagagt gtggcaatga

aacatcttac tagtttcaaa cgagaacttg
gcagaaaagca aaacaaaaga ggaggaaatg
cagttgtcat agcttgtgta ggagccatga
tgaccattaa caacacggac attgcagacg
acagatgctg ggtccgggca atcgatgtcg
aatgtcctaa gcttaccatg ggcaatgac
aagaagtcta cgtccaatat ggacggtgca
ggtccgtgtc ggtccaaaca catggggaga
tggattcaac gaaagccaca cgatatctca
ctggctatgc tttcctggcg gcggtacttg
gcgtgggtgtt taccatcctc ctgctgttgg
gaatgggcaa ccgtgacttc atagaaggag
tagaaggaga tagctgcttg acaatcatgg
tgattaacat cgaagccagc caacttgctg
tactgacat ctcgacggtg gctcggtgcc
gagctgatag tagctatgtg tgcaaacaag
gtggactttt cgggaaggga agcattgaca
cgattgggag aacaatccag ccagaaaaca
gaaccaccac ctcggaaaac catgggaatt
caaagtttac agtaacaccc aatgctcctt
aagtcacact ggactgtgaa ccaaggagtg

360 gaacactcat tgacgccgtg aacaagcggg
420 aaggctcaat catgtggctc gcgagtttgg
480 agttgtcaaa tttccaaggg aagcttttga
540 tcatcgatgat tcctacctca aaaggagaga
600 gctacatgtg tgaggacact atcacgtacg
660 cagaggatgt ggattgctgg tgtgacaacc
720 cgcgaccag gcattccaag cgaagcagga
780 gttcactagt gaataaaaaa gaggcttggc
840 tgaaaactga gaactggatc ataaggaatc
900 gctggatgct tggcagtaac aatggtcaac
960 tcgctccggc ttacagtttt aattgtctgg
1020 ccagtggagc cacttgggtg gacttagtgc
1080 caaacgacaa accaacattg gacgtccgca
1140 aggtcagaag ctactgctat catgcttcag
1200 ccacgactgg agaagcccac aacgagaagc
1260 gtttactga tcgtgggtgg ggcaacggat
1320 catgtgcaaa attctcctgc accagtaagg
1380 tcaaatacga agttggcatt tttgtgcatg
1440 attcagcgca agtaggggcg tcccaggcgg
1500 cgataaccct caaacttggg gactacggag
1560 gactgaacac tgaagcgttt tacgtcatga

ccgtggggtc aaagtcattt ctggtcata
ggacgtcccc ttcgagcaca gcgtggagaa
cgcacgccac aaaacagtcc gttgttgctc
cgctggcagg agccatcgtg gtggagtact
tgaaatgtag gctgaaaatg gacaaactgg
cagaaaaatt ctcgttcgcg aaaaatccgg
aactctccta ttctgggagt gatggcccct
tcaatgacat gacccccgtt gggcggctgg
gtgccaactc aaaggtgctg gtcgagatgg
ttggaagggg agacaagcag atcaaccacc
aggctttttc aacaactttg aaggagctc
gggactttgg ctctattgga ggggtcttca
ttggtggcgc tttcagaaca ctctttgggg
gtgccctact actctggatg ggcatcaacg
tggccacagg aggtgtgctc gtgttcttag
ccattgacat cgcaagaaaa gagatgagat
tggaagcctg ggtggatagg tataaatatt
tcgtccacaa agcgcacaag gaaggcgtgt
accaaattgt ggaagccgtg cgggacgaat
acctcagtgt ggttgtgaac aagcccgtgg
ccatgacgca agagaagttt gaaatgggct

1620 gggaatggtt tcatgacctc gctctcccct
1680 acagagaact cctcatggaa ttggaagagg
1740 ttgggtcaca ggaaggaggc ctccatcagg
1800 caagctcagt gaagttaaca tcaggccacc
1860 ctctgaaagg cacaacctat ggcatgtgta
1920 cggacactgg ccacggaaca gttgtcattg
1980 gcaaaattcc gattgtctcc gttgcgagcc
2040 tgacagtga ccccttcgtc gcgacttcca
2100 aacccccctt cggagactcc tacatcgtag
2160 attggcataa agctggaagc acgctgggca
2220 aaagactggc agcgttgggc gacacagcct
2280 actccatagg aaaggccgtt caccaagtgt
2340 gaatgtcttg gatcacacaa gggttaatgg
2400 cagagatcg atcaattgct ttggccttct
2460 cgaccaatgt gcatgctgac actggatgtg
2520 gcggaagtgg catcttcgtg cacaacgacg
2580 tgccagaaac gccagatcc ctagcgaaga
2640 gcggagtcag atctgtcact agactggagc
2700 tgaacgtcct gctcaaagag aatgcagtgg
2760 ggagatatcg ctacgcccc aacgcctgt
2820 ggaaagcatg gggaaaaagc attctctttg

ccccggaatt ggctaaactcc acatttgttg
atgagcacag agcctggaac agcatgcaaa
cccgtgtgtg gctgaagatt agagaggaaa
gcacagctgt caaaggacat gtggcagttc
gctacaacga cacatggaaa cttgagaggg
ggccagagac acacactctt tggggagatg
ataccatagc cggaccaaaa agcaagcaca
agggaccttg ggacgaaaac ggcatagtct
tcaccatcac agaggattgt ggcaagagag
gaaagttgat tactgactgg tgctgtcgca
cagaaaatgg ctgctggtac ggaatggaaa
tcgtcagatc acaggttgat gctttcaatg
ttctgggtgat gtttctggcc acccaggagg
ccattcctgc ggttttgggg gccctgcttg
atttggcgag gtatgtggtg ctagtcgctg
acgtcctgca ccttgctttg attgccgttt
acatgcttag cacgagatgg acgaaccaag
tctttcaatt ggcctcagta gatctgcaaa
ctatagcatg gatgattgtt cgagcgatca
cagtcttagc gcttctaact ccgggaatga
tccttctcgt catagggatt tgctccctgc

2880 tagatggacc tgagacaaag gaatgtcctg
2940 tcgaagactt cggcttttgt atcacatcaa
3000 gcactgacga gtgtgatgga gcgatcatag
3060 atagtgactt gtcgtactgg attgagagtc
3120 cagtcttttg agaggtcaaa tcttgactt
3180 gtgttgagga aagtgaactc atcatccgc
3240 atcggaggga aggttcaaaa acacaaaacc
3300 tggactttga ttattgccca gggacaaaag
3360 gcccttcggt cagaaccact actgacagt
3420 gttgctccct tccgccccta cgattccgga
3480 tcagacctgt taggcatgat gaaacaacac
3540 gtgaaatggt tgaccctttt cagctgggcc
3600 tccttcgcaa gaggtggacg gccagattga
3660 tgctgatgct tgggggcac acttacactg
3720 ctgctttcgc agaggccaat aatggaggag
3780 ttaagatcca accagctttt ctagtgatga
3840 aaaacgtggt cctggtccta ggggctgcct
3900 tcggagtcca cggaatcctg aatgccgccg
3960 ccttccccac aacctcctcc gtcaccatgc
4020 gggctctata cctagacact tacagaatca
4080 tgcaagagag gaaaaagacc atggcaaaaa

agaaaggagc tgtactcttg ggcttagcgc
ccatagctgc tggactaatg gtctgcaacc
agtttctgtc ggcagtcgga ttgatgtttg
ttgaatccat gtcaataccc ttcattgctgg
caggaaaagc aacagatatg tggctcgaac
ctgcaatcac aggaagcagt cggaggctgg
acttgattga tgatcccggc gttccatgga
gcttagccgc cctcacgcct tgggccattg
taaaaacaac aaaaagaggg ggcgtgtttt
aaggagacac cactacagga gtctaccgaa
aggctggcgt cggagtcattg tacgagaatg
gggcagccat tatgagtgga gaaggaaaat
accgcatagc ttacggaggc ccatggagat
tgcaagtgat cgtggttagaa ccggggaagg
tgtttcggac ccccttcggg gaggttgggg
ccggctcacc cattctggat tccaatggag
agcttggcga tggctcatac gtcagcgcca
tcccagaagc ttacactcca aacatgttaa
accctggttc agggaaaacc aggaaaattc
agcgctaag aacagctgtg ttggcaccga
ctttgagagg gctcccagta cgataccaaa

4140 tcacatccac tggatggttc tcgcccacca
4200 caaacaagaa gagagggtgg ccagctactg
4260 ccatcgtagg tggtttggcc gagttggata
4320 caggtcttat ggcagtgctc tacgtagtgt
4380 gggccgccga catcagctgg gagatggatg
4440 atgtgaaact ggatgatgac ggagattttc
4500 aagtttgggt cttgcgcatg tcttgcatg
4560 ttcccggcgc tttcggttac tggctcactt
4620 gggacacgcc atccccgaaa ccttgcttaa
4680 tcatggctag agggattctt ggcacctacc
4740 tttccacac actatggcac acaactagag
4800 tgacgccata ctggggtagc gtgaaagaag
4860 ttgatcgaaa atggaatgga acagatgacg
4920 ctgcggtaaa catccagaca aaaccaggag
4980 ctgttagcct ggattacccg cgaggaacat
5040 acatcatagg cctatacggc aatggagtig
5100 tcgtgcaggg tgaccgtcag gaggaaccag
5160 gaaagagaca gatgactgtg ttagatttgc
5220 tgccacaaat aattaaggat gcaatccagc
5280 cgcggtggt agcagcagaa atggcagaag
5340 cttcagcagt gcagagagag caccaaggga

atgaaatagt ggatgtgatg tgccacgcca
gagtgcccaa ctacaatctg tttgtcatgg
tagccgcacg aggatacatc gctaccaagg
tgacagcgac cccgcctgga accacggatc
atttacaaga tgagatacca gacagggcat
atgcgggtaa aaccgtgtgg tttgtggcga
gcctccaaag agcgggaaaa aaggtcatcc
acccaaaatg taagaatgga gactgggatt
gggctaactt cgggtgcgagc agggtcacg
tagaagaggg agaaggcaga gtcacctcg
cagctcaacg gaggggcaga gtaggcagaa
atggaggggc taccagtga gacgacagta
tgttagacaa catacacatg cccaatgggc
aaaaggcttt cacaatggat ggcaataacc
tagagctgct taggacggct gaccttccgg
gcattcagta caccgacaga aagtgggtgtt
aggacaacac cgaggtagag atagtcaccc
gatggcttga tgcaagagta tacgcagatc
cagcaggaaa gagatcggcc gttagcttca
tcatgggaaa gacgcgggaa gctttagaca
gtgggaaggc acaccgaatg gctctcgaag

5400 ctctgaccca cagattgatg tcaccgaaca
5460 atgaagctca tttcaccgac ccagccagca
5520 tggaattagg agaggcagca gccatcttta
5580 cttttcccga ctcaaagcc ccaatccatg
5640 ggagcagtgg atacgaatgg atcacagaat
5700 gcgtaaaaat ggggaatgag attgcaatgt
5760 aactcaaccg caagtcctat gacacagaat
5820 ttgtcattac caccgacatc tctgaaatgg
5880 actgcagaaa gagcgtgaaa cccaccatct
5940 gaaaccatc tcccataacc agtgctagcg
6000 accccaacca agttggagat gaataccatt
6060 acctagccca ttggacagag gcaaagatca
6120 tggtggccca gctctatgga ccagagaggg
6180 gtctcagggg tgaagaaaag aaaaacttct
6240 tgtggctggc ctataagggt gcgtccaatg
6300 ttgatgggcc gcgcacgaat gccatactgg
6360 ggatgggtga gagaaagatc ctcaagccga
6420 accaagccct caagtgggtc aaagactttg
6480 tagaggtgct cggtcgcatg cctgagcatt
6540 ccatgtactt ggtcgcaacg gctgagaaag
6600 agttgccgga tgcactggaa accatcacac

ttattgttgc catcactgta atgacaggag
gtatagggaa gatgggtctt ggagctctag
cggcagaggt tcctggaacc aaaatagcag
tggttctcat cccagaaccg gaaaaacaga
ttctcatctg cgtcttgacc gtggttggag
aaaaaaccaa agcagatctc aagagcatgt
ctggattgcc aagcatggca ctggacctgc
ggagcacagt tgtgctaacc cctcttctga
catcgctagc ctcaattaac tcacaagctg
ctttcaccga tctagacctg accgttggcc
ccctcacaac gtttttgaca gccatggttc
ctggatggca agcagaagca ctcagggtg
agaatgccgt tgttgacgga atggtcgcca
ctctgatgca aaagaaagtc ggacaggtgc
tcgtcaacc taatgtcacc actgtgagag
tcaccttgtg ggataatgga gccagtgccg
gccatgtcat gcgaggtagc tacctggctg
acgtgacaa gccctccttg aaaaggggaa
ggaaggaaaa actaaatgcc atgagcagag
taatcgaggt ggaccgcact gaagcacgca
gacatccggt ttgcgcaggc tcagcaaaac

6660 gattcttcct actaatgatg cagcgaaagg
6720 tgctcacgct agctaccttc ttctgtggg
6780 ggacctgct gatcgccctg ctgctgatgg
6840 ggtcacagac agacaaccaa ctagcggtgt
6900 tgggtggcagc aaacgagtac gggatgctag
6960 ttggcggaaa gacacaggca tcaggactga
7020 gtccagccac agcctgggca ctgtatgggg
7080 agcacctgat cacgtcgga tatgtacca
7140 gctcattatt cgtcttgcca cgaggcgtgc
7200 tcgtcttcct tggctgctgg ggtcaaatca
7260 tggcgacact tcactatggg tacatgctcc
7320 cccagagaag gacggcggct ggaataatga
7380 ctgatgtgcc tgaactggaa aggactactc
7440 tcctcatagg ggtgagcgtg gcagcgtttc
7500 aagcaggggt gttggtgacg gcggctacgc
7560 ttitggaattc caccacagcc acgggactct
7620 gaggtcttat tgcttggact cttatcaaga
7680 ggcctggggg caggacgcta ggggagcagt
7740 aagagttttt taaataccgg agagaggcca
7800 gggctagacg tgaaaataac atagtgggag
7860 tccgttggct cgtggagaaa ggattcgtct

cgccaatagg aaaagtcatt gatctagggt
 caaccctgaa gaaggtccag gaagtcagag
 agccgatgct catgcagagc tacggctgga
 tgttctacaa accttcagag cctagtgaca
 caagtccaga agtgggaagaa caacgcacac
 tgcacgcagg acccagagag ttctgcataa
 tagaaaaaat ggaagtcttg cagcgccgct
 cccgaaactc caatcacgag atgtattggg
 ctgtgaacat gaccagccag gtactactgg
 caaagtatga ggaagatgtc aacctaggta
 ttcatagcaa tcaggagaaa atcaagaaga
 caacgtggca caaagaccct gaacacccat
 aggtgaaggc tactggctca gccagctctc
 aaccttggga cgccattgcc aacgtcacca
 gacagcaaag agttttcaag gagaaagtig
 tcaaggaagt gctcaacgag accaccaact
 gaccccgttt gtgcaccaag gaagaattta
 gagcagtgtt tgctgaacag aatcaatgga
 ggttttggga gatgggtcaat gaagagaggg
 gtatctacaa catgatggga aaaagagaga
 ggagcagggc catttggttc atgtggcttg

7920 gtgggcgtgg aggatggagc tactacgcag
 7980 gatacacgaa aggtggggcg ggacatgaag
 8040 acctggtctc ctgaagagt ggagtggatg
 8100 ccctgttctg tgacataggg gaatcctccc
 8160 tacgcgtcct agagatgaca tccgattggg
 8220 aagttctctg cccttacatg cccaaggtca
 8280 tcggaggtgg gctagtacgt ctccccctgt
 8340 ttagtggagc cgctggcaat gtggtgcacg
 8400 ggcgaatgga tcgcacagtg tggagagggc
 8460 gcggaacaag agccgtggga aagggagaag
 8520 gaatccagaa gcttaaagaa gaattcgcca
 8580 accgcacttg gacataccac ggaagctatg
 8640 tcgtcaacgg agtgggtgaag ctcatgagta
 8700 ccatggccat gactgacacc accccttttg
 8760 acacgaaagc tcctgagcca ccagctggag
 8820 ggctgtgggc ccacttgtca cgggaaaaaa
 8880 taaagaaagt caatagcaac gcggctcttg
 8940 gcacggcgcg tgaggctgtg gacgacccgc
 9000 aaaaccatct gcgaggagag tgtcacacat
 9060 agaagcctgg agagtttgga aaagctaaag
 9120 gagcacggta tcttgagttt gaagctttgg

ggttcctgaa tgaagaccac tggctgagcc
 caggcgtcca aaagttggga tacatcctcc
 tgtacgctga tgacaccgcc ggggtgggaca
 aagctaaggt gctggagctc ctagatgggtg
 aactgactta caggcacaaa gtggtcaagg
 tgatggacgt gatatcaaga gaagacccaaa
 tcaacacttt cacgaacatc gctgtccagc
 ttgggccaca acacttggaa cagctgccta
 tctttgagaa tggagaggag agagtgacca
 tcaagccgct ggacgacaga ttcgccacgg
 ttagaaaaga catccaggaa tgggaagcctt
 ccttctgctc taaccacttt caggagattg
 cgtgcagagg acaggatgag ctgataggca
 atgtgaagga cacagcttgc ctggcaaaag
 tccatcgtag ggacctgcgt ctcatggcaa
 ggggtgccac aggcaggaca tcctgggtcaa
 aagacatgct gcaggtctgg aacagagtct
 agactcccgt cacaagctgg acagacgttc
 gtggcagcct catcggaacg cgttccagag
 taaaccaggt tagagctgtc attgggaaag
 ggagatacga agacgtcttg atccaggaag

9180 gagagaattc aggaggtgga gtagaaggct
 9240 gtgacatagc aggaaagcaa ggagggaana
 9300 ctagaattac tagaactgat ttagaaaatg
 9360 aacaccgcat gctcgcccgg gccataattg
 9420 tcatgagacc tgcagcagaa ggaaagaccg
 9480 gggggagtgg acaggtggtc acttatgctc
 9540 tcgttaggct gatggaggct gagggggtca
 9600 ggaaaaacaa gatagctgtc aggacttggc
 9660 ggatggcgat cagcggagac gactgtgtcg
 9720 ccctccattt cctcaacgca atgtcaaagg
 9780 cgcacggctg gcacgattgg cagcaagttc
 9840 tgatgaaaga cggaaggagt atagttgtcc
 9900 gggctcgcat ctctccagga gctggatgga
 9960 catatgcaca gatgtggcta ctctatact
 10020 atgcgatttg ctacagcagt ccagttgatt
 10080 tacactcgaâ aggagagtgg atgaccacgg
 10140 ggattgaaga aatgaatgg atgatggata
 10200 cgtatgtggg aaagcgtgag gacatctggt
 10260 caacctgggc tgagaacatc tatgcggcga
 10320 aaaattatgt tgactacatg acctcactca
 10380 acagggtcat ctagtgtgac ttaaggtaga

aatgtaaata atgtgaatga gaaaatgcat
accggatact gggtagacgg tgctgcctgc
atctgacaac agaaagtgag aaagccctca
tggaagttga aagaccaacg tcaggccacg
ctgcgacgcc ccaggaggac tgggttacca
cgtctaggat gcaatagacg aggtgtaagg
aacaacatgc ggccaagcc ccctcgaagc
aggagacccc gcatttgcac caaacagcat
tctgctctat ctcaacatca gctactaggc
aggaagaaca caggatctcg agcggccgcg
agagggattt gttccctagg cctaattatt
ccttttctaa ttctcgtata ctatagttag
caattctcat gtttgacagc ttatcatcga
tattcaggcg tagcaaccag gcgtttaagg
cccgccctgc cactcatcgc agtactgttg
gccatcacia acggcatgat gaacctgaat
cgtataatat ttgccatgg tgaaaacggg
taaataaaaa ctggtgaaac tcacccaggg
aaacccttta gggaaatagg ccaggttttc
gtgtagaaac tgccggaaat cgtcgtggta
ttgctcatgg aaaacggtgt aacaagggtg

10440 gtatatggag tcaggccagc aaaagctgcc
10500 gtctcagtcc caggaggact gggtaacaa
10560 gaaccgtctc ggaagtaggt ccctgctcac
10620 aatttgtgcc actccgctgg ggagtgcggc
10680 aagccgttga ggccccacg gccaagcct
10740 actagagggt agaggagacc ccgtggaaac
10800 tgtagaggag gtggaaggac tagaggttag
10860 attgacacct gggaatagac tgggagatct
10920 acagagcgcc gaagtatgta gctggtggtg
10980 gaccgactag cctcttttcg gccttcgctg
11040 atttttaatt gcccaatagc tatacagagt
11100 tcgtattatc tagccgcccg ggccgtcgac
11160 atttctgcca ttcacccgct tattatcact
11220 gcaccaataa ctgccttaaa aaaattacgc
11280 taattcatta agcattctgc cgacatggaa
11340 cgccagcggc atcagcacct tgtcgccttg
11400 ggcaagaag ttgtccatat tggccacgtt
11460 attggctgag acgaaaaaca tattctcaat
11520 accgtaacac gccacatctt gcgaatatat
11580 ttactccag agcgatgaaa acgtttcagt
11640 aacactatcc catatcacca gtcaccgtc

tttcattgcc atacggaatt ccgatgagc
ggccggataa aacttgtgct tatTTTTctt
ctgaacggtc tggttatagg.tacattgagc
acgatgccat tgggatatat caacggtggt
ttccttagct cctgaaaatc tcgataactc
attatgggtga aagttggaac ctcttacgtg
ggcccagggc ttcccggtat caacagggac
ttccgtcaca ggtatttatt cgcgataagc
ggacagagaa agcgcggatc tgggaagtga
aggcggttgc cgccgctgct gctgacggtg
cgttccgcca ttcctatgcg atgcacatgc
aaagcctgat gggacataag tccatcagtt
tggatgtggc tgcccggcac cgggtgcagt
tgctgaaaca attatcctga gaataaatgc
gtggatatgc tgTTTTgtc tgTTaaacag
acgaaacagt cgggaaaatc tcccattatc
ctgtgtagcg tttataggaa gtagtgttct
gatttgaata tgccttcagg aacaatagaa
cggattatgt cagcaatgga cagaacaacc
ccttttacag ccagtagtgc tcgccgcagt
gaggaagcac cagggaacag cacttatata

11700 attcatcagg cgggcaagaa tgtgaataaa
11760 tacggtcttt aaaaaggccg taatatccag
11820 aactgactga aatgcctcaa aatgttcttt
11880 atatccagtg atTTTTtct ccatTTtagc
11940 aaaaaatacg cccggtagtg atcttatttc
12000 ccgatcaacg tctcattttc gccaaaagtt
12060 accaggattt atttattctg cgaagtgatc
12120 tcatggagcg gcgtaaccgt cgcacaggaa
12180 cggacagAAC ggtcaggacc tggattgggg
12240 tgacgttctc tgttccggtc acaccacata
12300 tgtatgccgg tataccgctg aaagttctgc
12360 caacggaagt ctacacgaag gTTTTtgcgc
12420 ttgcgatgcc ggagtctgat gcggttgcga
12480 cttggccttt atatggaaat gtggaactga
12540 agaagctggc tgTTatccac tgagaagcga
12600 gtagagatcc gcattattaa tctcaggagc
12660 gtcagtatgc ctgcaagcgg taacgaaaac
12720 atcttcgtgc ggtgttacgt tgaagtggag
12780 taatgaacac agaaccatga tgtggtctgt
12840 cgagcgacag ggcgaagccc tcgagtgagc
12900 ttctgcttac acacgatgcc tgaaaaaact

tcccttgggg ttatccactt atccacgggg
ttagatcttc ttttttagag cgcctttag
gttgtgacaa attgcccttt cagtgtgaca
acaaattgcc cttaaccctg tgacaaattg
tatccctgct tattgactct tttttattha
acatggatct gtcattggcg aaacagcggg
gcgaatcgtc cagtcaaacg acctcactga
acgtatgctg tatctgttcg ttgaccagat
tgacggatc tgcgagatcc atgttgctaa
ggaagccagt aaggatatac ggcaggcatt
ttatcgccct gaagaggatg ccggcgatga
caaacgtgcg cacagtccat ccagagggct
tcccttcttt atcgggttac agaaccggtt
aatcaccaat ccgtatgcca tgcgtttata
tggctcaggc atcgtctctc tgaaaatcga
aagttaccag cgtaigcctg acttccgccg
caacagcaga actccaatgc gcctctcata
tcatatcgta ttttccttcc gcgatatcac
tctgtcacag atttgagggt ggttcgtcac
cacagttttg ctgtttcctt cagcctgcat
tttaaggaag ccaaatttga gggcagtttg

12960 atatttttat aattattttt tttatagttt
13020 gcctttatcc atgctgggtc tagagaaggt
13080 aatcacctc aaatgacagt cctgtctgtg
13140 ccctcagaag aagctgtttt ttcacaaagt
13200 gtgtgacaat ctaaaaactt gtcacacttc
13260 tatcaatcac aagaaacgta aaaatagccc
13320 ggcggcatat agtctctccc gggatcaaaa
13380 cagaaaatct gatggcaccc tacaggaaca
13440 atatgctgaa atattcggat tgacctctgc
13500 gaagagtttc gcggggaagg aagtggtttt
13560 aaaaggctat gaatcttttc cttggtttat
13620 ttacagtgtg catatcaacc catatctcat
13680 tacgcagttt cggcttagtg aaacaaaaga
13740 cgaatccctg tgtcagtatc gtaagccgga
13800 ctggatcata gagcggttacc agctgcctca
13860 ccgcttctg caggtctgtg ttaatgagat
13920 cattgagaaa aagaaaggcc gccagacgac
13980 ttccatgacg acaggatagt ctgagggtta
14040 atttgttctg acctactgag ggtaatttgt
14100 ggattttctc atactttttg aactgtaatt
14160 tcacagttga tttccttctc tttcccttcg

tcatgtgacc tgatatcggg ggtagttcg
ttattactct gaattggcta tccgcgtgtg
atatttcttc ttgcgctgag cgtaagagct
cgccagttcg ctgcgtatgc tcggttacac
actgaggtat gtgctcttct tatctccttt
gcggtttttt gatgactttg cgattttgtt
aaaaaacgc aaagcaatga ttaaaggatg
cagtgcataa acgctgggtca tgaaatgacg
gacagcccgg aagcgaggaa aataaaccgg
gttgggggtt cttctcaggc tatcagagat
gatatggaaa ttcgaggacg ggttgagcaa
catatgcgtg atgtgtttgg tacgcgattg
atcgggggtt ctgcccataa aggtggcggt
caggatctgg ctctgaaggg gctacgtgtt
acagcctcaa tgtatcacgg atgggtacca
ctgcctttct atcttgggga aaaggacgat
ccggggcttg acattattcc ttctgtctg
ggcaaatttg atgaaggtaa actgccacc
gaaactgttg ctcatgacta tgatgtcata
ggcacgatta atgtcgtatg tgctgctgat
tttgactaca cctccgcact gcagtttttc

14220 tcatcattga tgagggttga ttatcacagt
14280 tacctctacc tggagttttt cccacggtgg
14340 atctgacaga acagttcttc tttgcttcct
14400 ggctgcggcg agcgctagtg ataataagtg
14460 tgtagtgttg ctcttatitt aaacaacttt
14520 gttgctttgc agtaaattgc aagatttaat
14580 ttcagaatga aactcatgga aacacttaac
14640 aaggctatcg ccattgcaca gttaaagat
14700 cgctggagaa taggtgaagc agcggattta
14760 gccgagaaag cagggcgact accgcacccg
14820 cgtgttggtt atacaattga acaaattaat
14880 cgacgtgctg aagacgtatt tccaccggtg
14940 tacaaaacct cagtttctgt tcatcttgct
15000 ttgctcgtgg aaggtaacga ccccaggga
15060 gatcttcata ttcatgcaga agacactctc
15120 gtcacttatg caataaagcc cacttgctgg
15180 gctctgcacc gtattgaaac tgagttaatg
15240 gatccacacc tgatgctccg actggccatt
15300 gttattgaca gcgcgcctaa cctgggtatc
15360 gtgctgattg ttcccacgcc tgctgagttg
15420 gatatgcttc gtgatctgct caagaacgtt

gatcttaaag ggttcgagcc tgatgtacgt
ggctctcagt ccccgatgat ggaggagcaa
aaaaatgttg tacgtgaaac ggatgaagtt
tttgaacagg ccattgatca acgctcttca
tggaacactg tctgcaatga aattttcgat
taatgaagcg tgcgcctgtt attccaaaac
cttcgttatac gacaccagct gccccgatgg
tggtcgcgg taatgccatt actttgcctg
aagtgtccg gggatgatagt gttgagaaga
accaggagct gcttactgag gacgcactgg
gtcaacagac accggcggttc ggtcgaagag
gtcgccgtcg taaagctgct gcacttaccg
tggatgatga gcagatggct gcattatcca
cttatgaacg tggtcagcgt tatgcaagcc
ctgcgctggc tgatgcggaa aatatttcac
ccaaattgcc taaatcagtt gttgctcttt
caggtgatgc acttcaaaaa gcctttacag
ctaaccttca tgagcagaaa aaagctgggg
ttttaacttc tgtgcttaaa acgtcatctg
agtttgctcc tggagcgaca gtattgtata
ggtctcgtgt tccaactgag tgtatagaga

15480 attttgctta ccaaatacag caatagtaat
15540 attcgggatg cctggggaag catggttcta
15600 ggtaaaggctc agatccgat gagaactgtt
15660 actggtgcct ggagaaatgc tctttctatt
15720 cgtctgatta aaccacgctg ggagattaga
15780 atacgctcaa tactcaaccg gttgaagata
15840 tggattcgtt aattgcgcgc gtaggagtaa
15900 tatgtggtcg ggatgtgaag ttactcttg
15960 cctctcgggt atggtcaggt aatgaacgtg
16020 atgatctcat cccttctttt ctactgactg
16080 tatctggtgt catagaaatt gccgatggga
16140 aaagtgatta tcgtgttctg gttggcgagc
16200 gattgggtaa cgattatcgc ccaacaagtg
16260 gattgcagaa tgaatttgct ggaaatattt
16320 gtaagattat taccgctgt atcaacaccg
16380 tttctcacc cggatgaacta tctgcccgg
16440 ataaagagga attacttaag cagcaggcat
16500 tgatatttga agctgaagaa gttatcactc
16560 catcaagaac tagtttaagc tcacgacatc
16620 agggcgataa aatgggtgctt aacctggaca
16680 aaattgaggc cattcttaag gaacttgaaa

agccagcacc ctgatgcgac cacgttttag
tttgttacag gccagaaagc ataactggcc
ttgtatcgtc ggtctgataa tcagactggg
ttattagtct gggaccacgg tcccactcgt
cgggccact cgtatcgtcg gtctgataat
tcggtctgat tattagtctg ggaccatggt
ctgggaccac ggtcccactc gtatcgtcgg
ctcgtatcgt cggtctgatt attagtctgg
attattagtc tgggaccacg atcccactcg
acggtcccac ttgtattgtc gatcagacta
tgtcaagggc aagtattgac atgtcgtcgt
ggttgtatgc ctgctgtgga ttgctgctgt
gttatgtgga caaaatacct ggttaccag
cgatgcaagt gtgtcgctgt cgacgagctc
cagtgtcgct gatttgtatt gtctgaagtt
aatacgatac ctgcgtcata attgattatt
gtgatatgta gatgataatc attatcactt
acggggcggc gacctcgcg gttttcgcta
ccgtttctct tcgtcataac ttaatgtttt
acgacaggtg ctgaaagcga gctttttggc
gtggaatgaa caatggaagt ccgagctcat

16740 tctacgttta tctgtcttta cttaatgtcc
16800 tgaatattct ctctgggccc actgttccac
16860 accacgggcc cactcgtatc gtcggtctga
16920 atcgtcggtc tgattattag tctgggacca
16980 cagactggga ccacgggcc actcgtatcg
17040 cccactcgta tcgtcggtct gattattagt
17100 tctgattatt agtctggaac cacggtccca
17160 gaccacggtc ccactcgtat cgtcggtctg
17220 tgttgtcggt ctgattatcg gtctgggacc
17280 tcagcgtgag actacgattc catcaatgcc
17340 aacctgtaga acggagtaac ctcggtgtgc
17400 gtcttgctta tccacaacat tttgcgcacg
17460 gccgtgccgg cacgttaacc gggctgcatc
17520 gcgagctcgg acatgaggtt gccccgtatt
17580 gtttttacgt taagttgatg cagatcaatt
17640 tgacgtggtt tgatggcctc cacgcacgtt
17700 tacgggtcct ttccggtgat ccgacaggtt
17760 tttatgaaaa ttttccggtt taaggcgttt
17820 tatttaaaat accctctgaa aagaaaggaa
17880 ctctgtcggt tcctttctct gttttgtcc
17940 cgctaataac ttcgtatagc atacattata

cgaagttata ttcgatgcgg cgctgaggtc
 accaggcctg aatcgcccca tcatccagcc
 ctttgttgta ggtggaccag ttggtgatTT
 cgttgtcggg aagatgcgtg atctgatcct
 aaagccacgt gtctcaaaat ctctgatgtt
 gaacaataaa actgtctgct tacataaaca
 aacgggaaac gtcttgctcg acgatgataa
 atgctaaaac gcggcatacc ccgcgtattc
 tagaggcttt ccctagtcca actatagcgt
 aattaatata taaccttatg tatcatacac

18000 tgcctcgtga agaaggtgtt gctgactcat
 18060 agaaagtgag ggagccacgg ttgatgagag
 18120 tgaacttttg ctttgccacg gaacgggtctg
 18180 tcaactcagc aaaagttcga tttattcaac
 18240 acattgcaca agataaaaaat atatcatcat
 18300 gtaatacaag ggggtgttatg agccatatTC
 18360 gctgtcaaac atgagaattg ggctgtcaat
 18420 ccactagtta attaacctgc agggggctgt
 18480 atggacatat tgtcgttaga acgcggctac
 18540 atacgattta ggggacacta tag

18563 <210> 45 <211> 18565 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <
 223> sequence for pBACSP6/JVFLx/XbaI <400> 45 agaagtttat ctgtgtgaac ttcttgctt

agtatcgttg agaagaatcg agagattagt
 taaccatgac taaaaaacca ggagggcccg
 gcggcctacc ccgcgtattc ccactagtgg
 acggcagagg accagtacgt ttcgtgctgg
 tagccccgac caaggcgctt ttaggccgat
 aacatcttac tagtttcaaa cgagaacttg
 gcagaaagca aaacaaaaga ggaggaaatg
 cagttgtcat agcttgtgta ggagccatga
 tgaccattaa caacacggac attgcagacg

60 gcagttttaa cagtttttta gaacggaaga
 120 gtaaaaaccg ggctatcaat atgctgaaac
 180 gagtgaagag ggtagtaatg agcttgttgg
 240 ctcttatcac gtctttcaag tttacagcat
 300 ggaaagcagt ggaaaagagt gtggcaatga
 360 gaacactcat tgacgccgtg aacaagcggg
 420 aaggctcaat catgtggctc gcgagtttgg
 480 agttgtcaaa tttccaaggg aagcttttga
 540 tcatcgtgat tcctacctca aaagagagaga

acagatgctg ggtccgggca atcgatgtcg
aatgtcctaa gcttaccatg ggcaatgac
aagaagtcta cgtccaatat ggacggtgca
ggtccgtgtc ggtccaaaca catggggaga
tggattcaac gaaagccaca cgatatctca
ctggctatgc tttcctggcg gcggtacttg
gcgtggtgtt taccatcctc ctgctgttgg
gaatgggcaa ccgtgacttc atagaaggag
tagaaggaga tagctgcttg acaatcatgg
tgattaacat cgaagccagc caacttgctg
tcactgacat ctcgacggtg gctcggtgcc
gagctgatag tagctatgtg tgcaacaag
gtggactttt cgggaaggga agcattgaca
cgattgggag aacaatccag ccagaaaaca
gaaccaccac ctcggaaaac catgggaatt
caaagtttac agtaacaccc aatgctcctt
aagtcacact ggactgtgaa ccaaggagtg
ccgtggggtc aaagtcattt ctggccata
ggacgtcccc ttcgagcaca gcgtggagaa
cgcacgccac aaaacagtcc gttgttgctc
cgctggcagg agccatcgtg gtggagtact

600 gctacatgtg tgaggacact atcacgtacg
660 cagaggatgt ggattgctgg tgtgacaacc
720 cgcggaccag gcattccaag cgaagcagga
780 gttcactagt gaataaaaaa gaggcttggc
840 tgaaaactga gaactggatc ataaggaatc
900 gctggatgct tggcagtaac aatggtaaac
960 tcgctccggc ttacagtttt aattgtctgg
1020 ccagtggagc cacttgggtg gacttagtgc
1080 caaacgacaa accaacattg gacgtccgca
1140 aggtcagaag ctactgctat catgcttcag
1200 ccacgactgg agaagcccac aacgagaagc
1260 gtttactga tcgtgggtgg ggcaacggat
1320 catgtgcaaa attctcctgc accagtaagg
1380 tcaaatacga agttggcatt tttgtgcatg
1440 attcagcgca agtaggggcg tcccaggcgg
1500 cgataaccct caaacttggt gactacggag
1560 gactgaacac tgaagcgttt tacgtcatga
1620 gggaatggtt tcatgacctc gctctcccct
1680 acagagaact cctcatggaa tttgaagagg
1740 ttgggtcaca ggaaggaggc ctccatcagg
1800 caagctcagt gaagttaaca tcaggccacc

tgaaatgtag gctgaaaatg gacaaactgg
cagaaaaatt ctcttcgcg aaaaatccgg
aactctccta ttctgggagt gatggcccct
tcaatgacat gacccccgtt gggcggctgg
gtgccaactc aaaggtgctg gtcgagatgg
ttggaagggg agacaagcag atcaaccacc
aggctttttc aacaactttg aaggagctc
gggacttttg ctctattgga ggggtcttca
ttggtggcgc tttcagaaca ctctttgggg
gtgccctact actctggatg ggcatcaacg
tggccacagg aggtgtgctc gtgttcttag
ccattgacat cgcaagaaaa gagatgagat
tggaagcctg ggtggatagg tataaatatt
tcgtccacaa agcgcacaag gaaggcgtgt
accaaattgt ggaagccgtg cgggacgaat
acctcagtgt ggttgtgaac aagcccgtgg
ccatgacgca agagaagttt gaaatgggct
ccccggaatt ggctaactcc acatttgttg
atgagcacag agccttggaac agcatgcaaa
cccgtgtgtg gctgaagatt agagaggaaa
gcacagctgt caaaggacat gtggcagttc

1860 ctctgaaagg cacaacctat ggcatgtgta
1920 cggacactgg ccacggaaca gttgtcattg
1980 gcaaaattcc gattgtctcc gttgcgagcc
2040 tgacagtga ccccttcgtc gcgacttcca
2100 aacccccctt cggagactcc tacatcgtag
2160 attggcataa agctggaagc acgctgggca
2220 aaagactggc agcgttgggc gacacagcct
2280 actccatagg aaaggccgtt caccaagtgt
2340 gaatgtcttg gatcacacaa gggttaatgg
2400 cacgagatcg atcaattgct ttggccttct
2460 cgaccaatgt gcatgctgac actggatgtg
2520 gcggaagtgg catcttcgtg cacaacgacg
2580 tgccagaaac gccagatcc ctagcgaaga
2640 gcggagtcag atctgtcact agactggagc
2700 tgaacgtcct gctcaaagag aatgcagtgg
2760 ggagatatcg ctgagcccca aaacgcctgt
2820 ggaaagcatg gggaaaaagc attctctttg
2880 tagatggacc tgagacaaag gaatgtcctg
2940 tcgaagactt cggcttttgt atcacatcaa
3000 gcaactgacga gtgtgatgga gcgatcatag
3060 atagtgactt gtcgtactgg attgagagtc

gctacaacga cacatggaaa cttagagaggg
 ggccagagac acacactctt tggggagatg
 ataccatagc cggaccaaaa agcaagcaca
 agggaccttg ggacgaaaac ggcatagtct
 tcaccatcac agaggattgt ggcaagagag
 gaaagttgat tactgactgg tgctgtcgca
 cagaaaatgg ctgctggtac ggaatggaaa
 tcgtcagatc acaggttgat gctttcaatg
 ttctggtgat gtttctggcc acccaggagg
 ccattcctgc ggttttgggg gccctgcttg
 atttggcgag gtatgtggtg ctagtgcctg
 acgtcctgca ccttgctttg attgccgttt
 acatgcttag cagagatgg acgaaccaag
 tctttcaatt ggcctcagta gatctgcaaa
 ctatagcatg gatgattgtt cgagcgatca
 cagtcttagc gcttctaact ccgggaatga
 tccttctcgt catagggatt tgctccctgc
 agaaaggagc tgtactcttg ggcttagcgc
 ccatagctgc tggactaatg gtctgcaacc
 agtttctgtc ggcagtcgga ttgatgtttg
 ttgaatccat gtcaataccc ttcattgctgg

3120 cagtcttttg agagggtcaaa tcttgcactt
 3180 gtgttgagga aagtgaactc atcatcccgc
 3240 atcggaggga aggggtacaaa acacaaaacc
 3300 tggactttga ttattgccca gggacaaaag
 3360 gcccttcggt cagaaccact actgacagtg
 3420 gttgctccct tccgccccta cgattccgga
 3480 tcagacctgt taggcatgat gaaacaacac
 3540 gtgaaatggg tgaccctttt cagctggggc
 3600 tccttcgcaa gaggtggacg gccagattga
 3660 tgctgatgct tgggggcatc acttacactg
 3720 ctgctttcgc agaggccaat aatggaggag
 3780 ttaagatcca accagctttt ctagtatga
 3840 aaaacgtggg cctggctcta ggggctgcct
 3900 tcggagtcca cggaatcctg aatgccgccg
 3960 ccttccccac aacctcctcc gtcacatgc
 4020 gggctctata cctagacact tacagaatca
 4080 tgcaagagag gaaaaagacc atggcaaaaa
 4140 tcacatccac tggatggttc tcgccacca
 4200 caaacaagaa gagagggtgg ccagctactg
 4260 ccatcgtagg tggtttggcc gatttgata
 4320 caggtcttat ggcagtgtcc tacgtagtgt

caggaaaagc aacagatatg tggctcgaac
ctgcaatcac aggaagcagt cggaggctgg
acttgattga tgatcccggc gtcccatgga
gcttagccgc cctcacgcct tgggccattg
taaaaacaac aaaaagaggg ggcgtgtttt
aaggagacac cactacagga gtctaccgaa
aggctggcgt cggagtcatg tacgagaatg
gggcagccat tatgagtgga gaaggaaaat
accgcatagc ttacggaggc ccatggagat
tgcaagtgat cgtggtagaa ccggggaagg
tgtttcggac ccccttcggg gaggttgggg
ccggctcacc cattctggat tccaatggag
agcttggcga tggctcatac gtcagcgcca
tcccagaagc ttacactcca aacatgttaa
accctggttc agggaaaacc aggaaaattc
agcgcctaag aacagctgtg ttggcaccga
ctttgagagg gctcccagta cgatacaaaa
atgaaatagt ggatgtgatg tgccacgcca
gagtgcccaa ctacaatctg tttgtcatgg
tagccgcacg aggatacatc gctaccaagg
tgacagcgac cccgcctgga accacggatc

4380 gggccgccga catcagctgg gagatggatg
4440 atgtgaaact ggatgatgac ggagattttc
4500 aagtttgggt cttgcgcatg tcttgcatg
4560 ttcccgccgc tttcggttac tggctcactt
4620 gggacacgcc atccccgaaa ccttgcttaa
4680 tcatggctag agggattctt ggcacctacc
4740 tttccacac actatggcac acaactagag
4800 tgacgccata ctggggtagc gtgaaagaag
4860 ttgatcgaaa atggaatgga acagatgacg
4920 ctgcggtaaa catccagaca aaaccaggag
4980 ctgttagcct ggattaccgc cgaggaacat
5040 acatcatagg cctatacggc aatggagttg
5100 tcgtgcaggg tgaccgtcag gaggaaccag
5160 gaaagagaca gatgactgtg ttagatttgc
5220 tgccacaaat aattaaggat gcaatccagc
5280 cgcggtggt agcagcagaa atggcagaag
5340 cttcagcagt gcagagagag caccaaggga
5400 ctctgacca cagattgatg tcaccgaaca
5460 atgaagctca tttcaccgac ccagccagca
5520 tggaattagg agaggcagca gccatcttta
5580 cttttccga ctcaaatgcc ccaatccatg

atttacaaga tgagatacca gacagggcat
 atgcgggtaa aaccgtgtgg tttgtggcga
 gcctccaaag agcgggaaaa aaggtcatcc
 acccaaaatg taagaatgga gactgggatt
 gggctaactt cggtagcgagc agggcatcgc
 tagaagaggg agaaggcaga gtcattcctgc
 cagctcaacg gaggggcaga gtaggcagaa
 atggaggggc taccagtga gatgacagta
 tgttagacaa catacacatg cccaatgggc
 aaaaggcttt cacaatggat ggcgaatacc
 tagagctgct taggacggct gaccttcgga
 gcattcagta caccgacaga aagtgggtgtt
 aggacaacac cgaggtagag atagtcaccc
 gatggcttga tgcaagagta tacgcagatc
 cagcaggaaa gagatcggcc gtttagcttca
 tcatgggaaa gacgcgggaa gctttagaca
 gtgggaaggc acaccgaatg gctctcgaag
 ttattgttgc catcactgta atgacaggag
 gtatagggaa gatgggtctt ggagctctag
 cggcagaggt tcctggaacc aaaatagcag
 tggttctcat ccagaaccg gaaaaacaga

5640 ggagcagtgg atacgaatgg atcacagaat
 5700 gcgtaaaaat ggggaatgag attgcaatgt
 5760 aactcaaccg caagtcctat gacacagaat
 5820 ttgtcattac caccgacatc tctgaaatgg
 5880 actgcagaaa gagcgtgaaa cccaccatct
 5940 gaaacccatc tcccataacc agtgctagcg
 6000 accccaacca agttggagat gaataccatt
 6060 acctagccca ttggacagag gcaaagatca
 6120 tggtagccca gctctatgga ccagagaggg
 6180 gtctcagggg tgaagaaaag aaaaacttct
 6240 tgtggctggc ctataagggtg gcgtccaatg
 6300 ttgatgggcc gcgcacgaat gccatactgg
 6360 ggatgggtga gagaaagatc ctcaagccga
 6420 accaagccct caagtgggtc aaagactttg
 6480 tagaggtgct cggtagcatg cctgagcatt
 6540 ccatgtactt ggtcgcaacg gctgagaaaag
 6600 agttgccgga tgcaactggaa accatcacac
 6660 gattcttcct actaatgatg cagcgaaagg
 6720 tgctcacgct agctaccttc ttctgtggg
 6780 ggaccctgct gatcgccctg ctgctgatgg
 6840 ggtcacagac agacaaccaa ctagcgggtgt

ttctcatctg cgtcttgacc gtggttggag
 aaaaaaccaa agcagatctc aagagcatgt
 ctggattgcc aagcatggca ctggacctgc
 ggagcacagt tgtgctaacc cctcttctga
 catcgctagc ctcaattaac tcacaagctg
 ctttcaccga tctagacctg accgttggcc
 ccctcacaac gtttttgaca gccatggttc
 ctggatggca agcagaagca ctcagggctg
 agaatgccgt tgttgacgga atggtcgcca
 ctctgatgca aaagaaagtc ggacaggtgc
 tcgtcaacc taatgtcacc actgtgagag
 tcaccttgtg ggataatgga gccagtccg
 gccatgtcat gcgaggtagc tacctggctg
 acgtgacaa gccctccttg aaaaggggaa
 ggaaggaaaa actaaatgcc atgagcagag
 taatcgaggt ggaccgcact gaagcacgca
 gacatccggt ttcgcgaggc tcagcaaac
 cgccaatagg aaaagtcatt gatctagggt
 caaccctgaa gaaggtccag gaagtcagag
 agccgatgct catgcagagc tacggctgga
 tgttctacaa accttcagag cctagtgaca

6900 tggtaggcagc aaacgagtac gggatgctag
 6960 ttggcggaaa gacacaggca tcaggactga
 7020 gtccagccac agcctgggca ctgtatgggg
 7080 agcacctgat cacgtcgga tatgtcacca
 7140 gctcattatt cgtcttgcca cgaggcgtgc
 7200 tcgtcttctt tggctgctgg ggtcaaatca
 7260 tggcgacact tcactatggg tacatgctcc
 7320 cccagagaag gacggcggct ggaataatga
 7380 ctgatgtgcc tgaactggaa aggactactc
 7440 tcctcatagg ggtgagcgtg gcagcgtttc
 7500 aagcaggggt gttggtgacg gcggctacgc
 7560 tttggaattc caccacagcc acgggactct
 7620 gaggtcttat tgcttggact cttatcaaga
 7680 ggcctggggg caggacgcta ggggagcagt
 7740 aagagttttt taaataccgg agagaggcca
 7800 gggctagacg tgaaaataac atagtgggag
 7860 tccgttggct cgtggagaaa ggattcgtct
 7920 gtgggcgtgg aggatggagc tactacgcag
 7980 gatacacgaa aggtggggcg ggacatgaag
 8040 acctggtctc cttgaagagt ggagtggatg
 8100 ccctgttctg tgacataggg gaatcctccc

caagtccaga agtgggaagaa caacgcacac
tgcattcgagg acccagagag ttctgcataa
tagaaaaaat ggaagttctg cagcgccgct
cccgaaactc caatcacgag atgtattggg
ctgtgaacat gaccagccag gtactactgg
caaagtatga ggaagatgtc aacctaggta
ttcatagcaa tcaggagaaa atcaagaaga
caacgtggca caaagaccct gaacacccat
aggtgaaggc tactgggtca gccagctctc
aaccttggga cgccattgcc aacgtcacca
gacagcaaag agttttcaag gagaaagttg
tcaaggaagt gctcaacgag accaccaact
gaccccgctt gtgcaccaag gaagaattta
gagcagtgtt tgctgaacag aatcaatgga
ggttttggga gatgggtcaat gaagagaggg
gtatctacaa catgatggga aaaagagaga
ggagcagggc catttgggtc atgtggcttg
ggttcctgaa tgaagaccac tggctgagcc
caggcgtcca aaagtggga tacatcctcc
tgtacgtga tgacaccgcc gggtgggaca
aagctaaggt gctggagctc ctagatggtg

8160 tacgcgtcct agagatgaca tccgattggt
8220 aagttctctg cccttacatg cccaaggtca
8280 tcggaggtgg gctagtacgt ctccccctgt
8340 ttagtggagc cgctggcaat gtggtgcacg
8400 ggcgaatgga tcgcacagtg tggagagggc
8460 gcggaacaag agccgtggga aagggagaag
8520 gaatccagaa gcttaaagaa gaattcgcca
8580 accgcacttg gacataccac ggaagctatg
8640 tcgtcaacgg agtgggtgaag ctcatgagta
8700 ccatggccat gactgacacc accccttttg
8760 acacgaaagc tcctgagcca ccagctggag
8820 ggctgtgggc ccacttgtca cgggaaaaaa
8880 taaagaaagt caatagcaac gcggctcttg
8940 gcacggcgcg tgaggctgtg gacgacccgc
9000 aaaaccatct gcgaggagag tgtcacacat
9060 agaagcctgg agagtttgga aaagctaaag
9120 gagcacggta tcttgagttt gaagctttgg
9180 gagagaattc aggaggtgga gtagaaggct
9240 gtgacatagc aggaaagcaa ggagggaaaa
9300 ctagaattac tagaactgat ttagaaaatg
9360 aacaccgcat gctcgcccgg gccataattg

aactgactta caggcacaaa gtggtcaagg
tgatggacgt gatatcaaga gaagacaaaa
tcaacacttt cacgaacatc gctgtccagc
ttgggccaca acacttggaa cagctgccta
tctttgagaa tggagaggag agagtgacca
tcaagccgct ggacgacaga ttcgccacgg
ttagaaaaga catccaggaa tggaagcctt
ccttctgctc taaccacttt caggagattg
cgtgcagagg acaggatgag ctgataggca
atgtgaagga cacagcttgc ctggcaaaag
tccatcgtag ggacctgcgt ctcatggcaa
gggtgcccac aggcaggaca tcctggtcaa
aagacatgct gcaggtctgg aacagagtct
agactcccgt cacaagctgg acagacgttc
gtggcagcct catcggaacg cgttccagag
taaaccagggt tagagctgtc attgggaaag
ggagatacga agacgtcttg atccaggaag
aatgtaaata atgtgaatga gaaaatgcat
accggatact gggtagacgg tgctgcctgc
atctgacaac agaaagttag aaagccctca
tggaagttag aagaccaacg tcaggccacg

9420 tcatgagacc tgcagcagaa ggaaagaccg
9480 gggggagtgg acagggtggc acttatgctc
9540 tcgttaggct gatggaggct gagggggtca
9600 ggaaaaacaa gatagctgtc aggacttggc
9660 ggatggcgat cagcggagac gactgtgtcg
9720 ccctccatit cctcaacgca atgtcaaagg
9780 cgcacggctg gcacgattgg cagcaagttc
9840 tgatgaaaga cggaaggagt atagtgtcc
9900 gggctcgcat ctctccagga gctggatgga
9960 catatgcaca gatgtggcta ctctatact
10020 atgcgatttg ctacagcagt ccagtggatt
10080 tacactcgaa aggagagtgg atgaccacgg
10140 ggattgaaga aaatgaatgg atgatggata
10200 cgtatgtggg aaagcgtgag gacatctggt
10260 caacctgggc tgagaacatc tatgcggcga
10320 aaaattatgt tgactacatg acctcactca
10380 acagggtcat ctagtgtgac ttaaggtaga
10440 gtatatggag tcaggccagc aaaagctgcc
10500 gtctcagtcc caggaggact gggttaacaa
10560 gaaccgtctc ggaagtaggt cctgtctcac
10620 aatttgtgcc actccgtgg ggagtgcggc

ctgcgagcc ccaggaggac tgggttacca
 cgtctaggat gcaatagacg aggtgtaagg
 aacaacatgc ggcccaagcc ccctcgaagc
 aggagacccc gcatttgcac caaacagcat
 tctgctctat ctcaacatca gctactaggc
 aggaagaaca caggatctct agagcggccg
 tgagagggat ttgttccta ggcctaatta
 tgccttttct aattctcgta tactatagtg
 accaattctc atgtttgaca gcttatcatc
 cttattcagg cgtagcaacc aggcgtttta
 gccccgccct gccactcatc gcagtactgt
 aagccatcac aaacggcatg atgaacctga
 tgcgtataat atttgcccat ggtgaaaacg
 tttaaataca aactggtgaa actcaccag
 ataaaccctt tagggaaata ggccagggtt
 atgtgtagaa actgccggaa atcgtcgtgg
 gtttgctcat ggaaaacggt gtaacaaggg
 tctttcattg ccatacggaa ttccggatga
 aaggccggat aaaacttgtg cttatttttc
 agctgaacgg tctggttata ggtacattga
 ttacgatgcc attgggatat atcaacggtg

10680 aagccgttga ggccccacg gcccaagcct
 10740 actagagggt agaggagacc ccgtggaaac
 10800 tgtagaggag gtggaaggac tagaggttag
 10860 attgacacct gggaatagac tgggagatct
 10920 acagagcgcc gaagtatgta gctggtggtg
 10980 cggaccgact agcctctttt cggccttcgc
 11040 ttatttttaa ttgccaata cgtatacagag
 11100 agtcgtatta tctagccgcc cgggccgtcg
 11160 gaatttctgc cattcatccg cttattatca
 11220 gggcaccaat aactgcctta aaaaaattac
 11280 tgtaattcat taagcattct gccgacatgg
 11340 atgccagcg gcacagcac cttgtcgcct
 11400 ggggcgaaga agttgtccat attggccacg
 11460 ggattggctg agacgaaaaa catattctca
 11520 tcaccgtaac acgccacatc ttgcgaatat
 11580 tattcactcc agagcgatga aaacgtttca
 11640 tgaacactat cccatcac cagctcaccg
 11700 gcattcatca ggcgggcaag aatgtgaata
 11760 ttacggtct ttaaaaaggc cgtaatatcc
 11820 gcaactgact gaaatgcctc aaaatgttct
 11880 gtatatccag tgattttttt ctccatttta

gcttccttag ctctgaaaa tctcgataac	11940 tcaaaaaata cgcccggtag tgatcttatt
tcattatggt gaaagttgga acctcttacg	12000 tgccgatcaa cgtctcattt tcgccaaaag
ttggcccagg gcttcccggg atcaacaggg	12060 acaccaggat ttatttattc tgcgaagtga
tcttccgtca caggtattta ttcgcgataa	12120 gctcatggag cggcgtaacc gtcgcacagg
aaggacagag aaagcgcgga tctgggaagt	12180 gacggacaga acggtcagga cctggattgg
ggaggcgggt gccgccgctg ctgctgacgg	12240 tgtgacgttc tctgttccgg tcacaccaca
tacgttccgc cattcctatg cgatgcacat	12300 gctgtatgcc ggtataccgc tgaaagttct
gcaaagcctg atgggacata agtccatcag	12360 ttcaacggaa gtctacacga aggtttttgc
gctggatgtg gctgcccggc accgggtgca	12420 gtttgcatg ccggagtctg atgcggttgc
gatgctgaaa caattatcct gagaataaat	12480 gccttggcct ttatatggaa atgtggaact
gagtggatat gctgtttttg tctgttaaac	12540 agagaagctg gctgttatcc actgagaagc
gaacgaaaca gtcgggaaaa tctcccatta	12600 tcgtagagat ccgcattatt aatctcagga
gcctgtgtag cgtttatagg aagtagtggt	12660 ctgtcatgat gcctgcaagc ggtaacgaaa
acgatttgaa tatgccttca ggaacaatag	12720 aaatcttcgt gcggtgttac gttgaagtgg
agcggattat gtcagcaatg gacagaacaa	12780 cctaatgaac acagaacat gatgtggtct
gtcctttttac agccagtagt gctcgccgca	12840 gtcgagcgac agggcgaagc cctcgagtga
gcgaggaagc accagggaac agcacttata	12900 tattctgctt acacacgatg cctgaaaaaa
cttcccttgg ggttatccac ttatccacgg	12960 ggatattttt ataattattt tttttatagt
ttttagatct tcttttttag agcgccttgt	13020 aggcctttat ccatgctggg tctagagaag
gtgttgtgac aaattgccct ttcagtgtga	13080 caaatcacc tcaaatgaca gtcctgtctg
tgacaaattg cccttaaccc tgtgacaaat	13140 tgccctcaga agaagctgtt ttttcacaaa

gttatccctg cttattgact cttttttatt
tcacatggat ctgtcatggc ggaaacagcg
ccgcgaatcg tccagtcaaa cgacctcact
aaacgtatgc tgtatctgtt cgttgaccag
catgacggta tctgcgagat ccatgttgct
gcggaagcca gtaaggatat acggcaggca
ttttatcgcc ctgaagagga tgccggcgat
atcaaactg cgcacagtcc atccagaggg
attcccttct ttatcgggtt acagaaccgg
gaaatcacca atccgtatgc catgcgttta
gatggctcag gcatcgtctc tctgaaaatc
caaagttacc agcgtatgcc tgacttccgc
atcaacagca gaactccaat gcgcctctca
actcatatcg tattttcctt ccgcgatatc
tatctgtcac agatttgagg gtggttcgtc
gtcacagttt tgctgtttcc ttcagcctgc
tttttaagga agccaaattt gagggcagtt
cgtcatgtga cctgatatcg ggggttagtt
gtttattact ctgaattggc tatccgcgtg
ggatatctt tcttgcgctg agcgtaagag
ctcgccagtt cgctcgctat gctcggttac

13200 tagtgtgaca atctaaaaac ttgtcacact
13260 gttatcaatc acaagaaacg taaaaatagc
13320 gaggcggcat atagtctctc ccgggatcaa
13380 atcagaaaaat ctgatggcac cctacaggaa
13440 aaatatgctg aaatattcgg attgacctct
13500 ttgaagagtt tcgcggggaa ggaagtggtt
13560 gaaaaaggct atgaatcttt tccttggttt
13620 ctttacagtg tacatatcaa cccatatctc
13680 ttacgcagt ttcggcttag tgaaacaaaa
13740 tacgaatccc tgtgtcagta tcgtaagccg
13800 gactggatca tagagcgta ccagctgcct
13860 cgccgcttcc tgcaggtctg tgtaaatgag
13920 tacattgaga aaaagaaagg ccgccagacg
13980 acttccatga cgacaggata gtctgagggt
14040 acatttgctc tgacctactg agggtaatth
14100 atggattttc tcatactttt tgaactgtaa
14160 tgtcacagtt gatttccttc tctttccctt
14220 cgtcatcatt gatgagggtt gattatcaca
14280 tgtacctcta cctggagttt tcccacgggt
14340 ctatctgaca gaacagttct tctttgcttc
14400 acggctgcgg cgagcgctag tgataataag

tgactgaggt atgtgctctt cttatctcct
ttgcggtttt ttgatgactt tgcgattttg
ataaaaaaac gcaaagcaat gattaaagga
accagtgcac aaacgctggc catgaaatga
atgacagccc ggaagcgagg aaaataaccc
tagttggggc ttcttctcag gctatcagag
cggatatgga aattcgagga cgggttgagc
atcatatgag tgatgtgttt ggtacgcgat
tgatcggggc tgctgcccac aaaggtggcg
ctcaggatct ggctctgaag gggctacgtg
gaacagcctc aatgtatcac ggatgggtac
tcctgccttt ctatcttggg gaaaaggacg
ggccggggc tgacattatt ctttctgtc
tgggcaaatt tgatgaaggt aaactgccca
ttgaaactgt tgctcatgac tatgatgtca
tcggcacgat taatgtcgta tgtgctgctg
tgtttgacta cacctccgca ctgcagtttt
ttgatcttaa agggttcgag cctgatgtac
atggctctca gtccccgtgg atggaggagc
taaaaaatgt tgtacgtgaa acggatgaag
tttttgaaca ggccattgat caacgctctt

14460 tttgtagtgt tgctcttatt ttaaacaact
14520 ttgttgcttt gcagtaaatt gcaagattta
14580 tgttcagaat gaaactcatg gaaacactta
14640 cgaaggctat cgccattgca cagtttaatg
14700 ggcgctggag aatagggtgaa gcagcggatt
14760 atgccgagaa agcagggcga ctaccgcacc
14820 aacgtgttgg ttatacaatt gaacaaatta
14880 tgcgacgtgc tgaagacgta tttccaccgg
14940 tttaaaaaac ctacgtttct gttcatcttg
15000 ttttgctcgt ggaaggtaac gacccccagg
15060 cagatcttca tattcatgca gaagacactc
15120 atgtcactta tgcaataaag cccacttgct
15180 tggctctgca ccgtattgaa actgagttaa
15240 ccgatccaca cctgatgctc cgactggcca
15300 tagttattga cagcgcgcct aacctgggta
15360 atgtgctgat tgttcccacg cctgctgagt
15420 tcgatatgct tcgtgatctg ctcaagaacg
15480 gtattttgct taccaaatac agcaatagta
15540 aaattcggga tgcctgggga agcatggttc
15600 ttggtaaagg tcagatccgg atgagaactg
15660 caactggtgc ctggagaaat gctctttcta

tttgggaacc tgtctgcaat gaaattttcg
gataatgaag cgtgcgccctg ttattccaaa
tacttcgtta tcgacaccag ctgccccgat
aatggctcgc ggtaatgcca ttactttgcc
tgaagtgctc cggggtgata gtgttgagaa
tgaccaggag ctgcttactg aggacgcact
tggtcaacag acaccggcgt tcggtcgaag
gagtcgccgt cgtaaagctg ctgcacttac
gctggatgat gagcagatgg ctgcattatc
tgcttatgaa cgtggtcagc gttatgcaag
ttctgcgctg gctgatgcgg aaaatatctc
cgccaaattg cctaaatcag ttgttgctct
gtcaggatgat gcacttcaaa aagcctttac
atctaacctt catgagcaga aaaaagctgg
tcttttaact tctgtgctta aaacgtcatc
tcagtttgct cctggagcga cagtattgta
caggtctcgt gticcaactg agtgtataga
aaagccagca ccctgatgcg accacgtttt
cctttgttac aggccagaaa gcataactgg
acttgatcg tcggtctgat aatcagactg
gattattagt ctgggaccac ggtcccactc

15720 atcgtctgat taaaccacgc tgggagatta
15780 acatacgctc aataactcaac cggttgaaga
15840 ggtggattcg ttaattgcgc gcgtaggagt
15900 tgtatgtggc cgggatgtga agtttactct
15960 gacctctcgg gtatggtcag gtaatgaacg
16020 ggatgatctc atcccttctt ttctactgac
16080 agtatctggc gtcataaaaa ttgccgatgg
16140 cgaaagtgat tatcgtgttc tggttggcga
16200 cagattgggt aacgattatc gccaacaag
16260 ccgattgcag aatgaatttg ctggaaatat
16320 acgtaagatt attacccgct gtatcaacac
16380 tttttctcac cccggtgaac tatctgcccg
16440 agataaagag gaattactta agcagcaggc
16500 ggtgatattt gaagctgaag aagttatcac
16560 tgcatacaaga actagtttaa gctcacgaca
16620 taaggcgcat aaaatggcgc ttaacctgga
16680 gaaaattgag gccattctta aggaacttga
16740 agtctacgtt tatctgtctt tacttaatgt
16800 cctgaatatt ctctctgggc ccactgttcc
16860 ggaccacggc cccactcgta tcgtcggctc
16920 gtatcgtcgg tctgattatt agtctgggac

cacggtccca ctctatcgt cggctcgata
cgctcggctcg attattagtc tgggaccatg
gtctgggacc acggtccac tcgtatcgtc
cactcgtatc gtcggtctga ttattagtct
tgattattag tctgggacca cgatcccact
ccacggtccc acttgtattg tcgatcagac
cctgtcaagg gcaagtattg acatgctcgtc
gcggttgat gcctgctgtg gattgctgct
cggttatgtg gacaaaatac ctggttacct
tccgatgcaa gtgtgtcgt gtcgacgagc
ttcagtgtcg ctgatttgta ttgtctgaag
ttaatacgat acctgcgtca taattgatta
ttgtgatatg tagatgataa tcattatcac
ttacggggcg gcgacctgc gggttttcgc
ttccgttctt cttcgtcata acttaatgtt
aaacgacagg tgctgaaagc gagctttttg
ccgtggaatg aacaatggaa gtccgagctc
tacgaagtta tattcgatgc ggcgctgagg
ataccaggcc tgaatcgccc catcatccag
agctttgttg taggtggacc agttggtgat
tgcgttgtcg ggaagatgcg tgatctgatc

16980 atcagactgg gaccacggtc ccactcgtat
17040 gtcccactcg tatcgtcggc ctgattatta
17100 ggtctgatta ttagtctgga accacggtcc
17160 gggaccacgg tcccactcgt atcgtcggtc
17220 cgtgttgcg gtctgattat cggctcggga
17280 tatcagcgtg agactacgat tccatcaatg
17340 gtaacctgta gaacggagta acctcgggtg
17400 gtgtcctgct tatccacaac attttgcgca
17460 aggccgtgcc ggcacgttaa cgggctgca
17520 tcgagagctc ggacatgagg ttgccccgta
17580 ttgtttttac gttaagtga tgcagatcaa
17640 tttagcgtgg ttgatggcc tccacgcacg
17700 tttagcggtc ctttccggtg atccgacagg
17760 tatttatgaa aattttccgg tttaaggcgt
17820 ttattttaaa ataccctctg aaaagaaagg
17880 gcctctgtcg ttcccttct ctgtttttgt
17940 atcgctaata acttcgtata gcataatta
18000 tctgcctcgt gaagaaggcg ttgctgactc
18060 ccagaaagtg agggagccac ggttgatgag
18120 tttagaacttt tgctttgcca cggaacggtc
18180 cttcaactca gcaaaagttc gatttattca

acaaagccac gtgtctcaaa atctctgatg	18240 ttacattgca caagataaaa atatatcatc
atgaacaata aaactgtctg cttacataaa	18300 cagtaataca aggggtgtta tgagccatat
tcaacgggaa acgtcttgct cgacgatgat	18360 aagctgtcaa acatgagaat tgggtcgtca
atatgctaaa acgcggcata ccccgcgat	18420 tcccactagt taattaacct gcagggggct
gtagaggtc ttccctagtc caactatagc	18480 gtagggacat attgtcgtta gaacgcggct
acaattaata cataacctta tgtatcatac	18540 acatacgatt taggggacac tatag
18565 <210> 46 <211> 19038 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <	
223> sequence for pBACT7/JVFL/XhoI <400> 46 agaagtttat ctgtgtgaac ttcttggctt	
agtatcgttg agaagaatcg agagattagt	60 gcagttttaa cagtttttta gaacggaaga
taaccatgac taaaaaacca ggaggggccg	120 gtaaaaaccg ggctatcaat atgctgaaac
gcggcctacc ccgcgtattc ccactagtgg	180 gagtgaagag ggtagtaatg agcttgttgg
acggcagagg accagtacgt ttcgtgctgg	240 ctcttatac gttcttcaag ttacagcat
tagccccgac caaggcgctt ttaggccgat	300 ggaaagcagt ggaaaagagt gtggcaatga
aacatcttac tagtttcaaa cgagaacttg	360 gaacactcat tgacgccgtg aacaagcggg
gcagaaagca aaacaaaaga ggaggaaatg	420 aaggctcaat catgtggctc gcgagtttgg
cagttgtcat agcttgtgta ggagccatga	480 agttgtcaaa ttccaaggg aagcttttga
tgaccattaa caacacggac attgcagacg	540 tcatcgtgat tcctacctca aaaggagaga
acagatgctg ggtccgggca atcgatgtcg	600 gctacatgtg tgaggacact atcacgtacg
aatgtcctaa gcttaccatg ggcaatgatc	660 cagaggatgt ggattgctgg tgtgacaacc
aagaagtcta cgtccaatat ggacggtgca	720 cgcgaccag gcattccaag cgaagcagga
ggtccgtgtc ggtccaaaca catggggaga	780 gttcactagt gaataaaaaa gaggcttggc

tggattcaac gaaagccaca cgatatctca
 ctggctatgc tttcctggcg gcggtacttg
 gcgtggtgtt taccatcctc ctgctgttgg
 gaatgggcaa ccgtgacttc atagaaggag
 tagaaggaga tagctgcttg acaatcatgg
 tgattaacat cgaagccagc caacttgctg
 tcactgacat ctcgacggtg gctcggtgcc
 gagctgatag tagctatgtg tgcaaacaag
 gtggactttt cgggaaggga agcattgaca
 cgattgggag aacaatccag ccagaaaaca
 gaaccaccac ctcggaaaac catgggaatt
 caaagtttac agtaacaccc aatgctcctt
 aagtcacact ggactgtgaa ccaaggagtg
 ccgtgggggtc aaagtcattt ctggtccata
 ggacgtcccc ttcgagcaca gcgtggagaa
 cgcacgccac aaaacagtcc gttgttgctc
 cgctggcagg agccatcgtg gtggagtact
 tgaaatgtag gctgaaaatg gacaaactgg
 cagaaaaatt ctcgctcgcg aaaaatccgg
 aactctccta ttctgggagt gatggcccct
 tcaatgacat gacccccgtt gggcggctgg

840 tgaaaactga gaactggatc ataaggaatc
 900 gctggatgct tggcagtaac aatggtcaac
 960 tcgctccggc ttacagtttt aattgtctgg
 1020 ccagtggagc cacttgggtg gacttagtgc
 1080 caaacgacaa accaacattg gacgtccgca
 1140 aggtcagaag ctactgctat catgcttcag
 1200 ccacgactgg agaagcccac aacgagaagc
 1260 gtttactga tcgtgggtgg ggcaacggat
 1320 catgtgcaaa attctcctgc accagtaagg
 1380 tcaaatacga agttggcatt tttgtgcatg
 1440 attcagcgca agtaggggcg tcccaggcgg
 1500 cgataaccct caaacttggg gactacggag
 1560 gactgaacac tgaagcgttt tacgtcatga
 1620 gggaatggtt tcatgacctc gctctcccct
 1680 acagagaact cctcatggaa tttgaagagg
 1740 ttgggtcaca ggaaggaggc ctccatcagg
 1800 caagctcagt gaagttaaca tcaggccacc
 1860 ctctgaaagg cacaacctat ggcatgtgta
 1920 cggacactgg ccacggaaca gttgtcattg
 1980 gcaaaattcc gattgtctcc gttgcgagcc
 2040 tgacagtga ccccttcgtc gcgacttcca

gtgccaactc aaaggtgctg gtcgagatgg
 ttggaagggg agacaagcag atcaaccacc
 aggctttttc aacaactttg aaggagagctc
 gggacttttg ctctattgga ggggtcttca
 ttggtggcgc tttcagaaca ctctttgggg
 gtgccctact actctggatg ggcatcaacg
 tggccacagg aggtgtgctc gtgttcttag
 ccattgacat cgcaagaaaa gagatgagat
 tggaagcctg ggtggatagg tataaatatt
 tcgtccacaa agcgcacaag gaaggcgtgt
 accaaatgtg ggaagccgtg cgggacgaat
 acctcagtgt ggttgtgaac aagcccgtgg
 ccatgacgca agagaagttt gaaatgggct
 ccccgaatt ggctaactcc acatttgttg
 atgagcacag agcctggaac agcatgcaaa
 cccgtgtgtg gctgaagatt agagaggaaa
 gcacagctgt caaaggacat gtggcagttc
 gctacaacga cacatggaaa cttgagaggg
 ggccagagac acacactctt tggggagatg
 ataccatagc cggaccaaaa agcaagcaca
 agggaccttg ggacgaaaac ggcatagtct

2100 aacccccctt cggagactcc tacatcgtag
 2160 attggcataa agctggaagc acgctgggca
 2220 aaagactggc agcgttgggc gacacagcct
 2280 actccatagg aaaggccgtt caccaagtgt
 2340 gaatgtcttg gatcacacaa gggttaatgg
 2400 cacgagatcg atcaattgct ttggccttct
 2460 cgaccaatgt gcatgctgac actggatgtg
 2520 gcggaagtgg catcttcgtg cacaacgacg
 2580 tgccagaaac gccagatcc ctagcgaaga
 2640 gcggagtcag atctgtcact agactggagc
 2700 tgaacgtcct gctcaaagag aatgcagtgg
 2760 ggagatatcg ctacagcccca aaacgcctgt
 2820 ggaaagcatg gggaaaaagc attctctttg
 2880 tagatggacc tgagacaaag gaatgtcctg
 2940 tcgaagactt cggctttgggt atcacatcaa
 3000 gcaactgacga gtgtgatgga gcatcatag
 3060 atagtgactt gtcgtactgg attgagagtc
 3120 cagtcttttg agaggtaaaa tcttgcaatt
 3180 gtgttgagga aagtgaactc atcatccgc
 3240 atcggaggga agggtaaaaa acacaaaacc
 3300 tggactttga ttattgcca gggacaaaag

tcaccatcac agaggattgt ggcaagagag
gaaagttgat tactgactgg tgctgtcgca
cagaaaatgg ctgctggtac ggaatggaaa
tcgtcagatc acaggttgat gctttcaatg
ttctgggtgat gtttctggcc acccaggagg
ccattcctgc ggttttgggg gccctgcttg
atttggcgag gtatgtggtg ctagtcgctg
acgtcctgca ccttgctttg attgccgttt
acatgcttag cacgagatgg acgaaccaag
tctttcaatt ggcttcagta gatctgcaaa
ctatagcatg gatgattgtt cgagcgatca
cagtcttagc gcttctaact ccgggaatga
tccttctcgt catagggatt tgctccctgc
agaaaggagc tgtactcttg ggcttagcgc
ccatagctgc tggactaatg gtctgcaacc
agtttctgtc ggcagtcgga ttgatgtttg
ttgaatccat gtcaataccc ttcatgctgg
caggaaaagc aacagatatg tggctcgaac
ctgcaatcac aggaagcagt cggaggctgg
acttgattga tgatcccggc gttccatgga
gcttagccgc cctcacgcct tgggccattg

3360 gcccttcggt cagaaccact actgacagtg
3420 gttgctccct tccgccccta cgattccgga
3480 tcagacctgt taggcatgat gaaacaacac
3540 gtgaaatggt tgaccctttt cagctgggcc
3600 tccttcgcaa gaggtggacg gccagattga
3660 tgctgatgct tgggggcac cttacactg
3720 ctgctttcgc agaggccaat aatggaggag
3780 ttaagatcca accagctttt ctagtgatga
3840 aaaacgtggt cctggctcta ggggctgcct
3900 tcggagtcca cggaatcctg aatgccgccg
3960 ccttccccac aacctcctcc gtcaccatgc
4020 gggctctata cctagacact tacagaatca
4080 tgcaagagag gaaaaagacc atggcaaaaa
4140 tcacatccac tggatggttc tcgcccacca
4200 caaacaagaa gagagggtgg ccagctactg
4260 ccatcgtagg tggtttggcc gagttggata
4320 caggtcttat ggcagtgtcc tacgtagtgt
4380 gggccgccga catcagctgg gagatggatg
4440 atgtgaaact ggatgatgac ggagattttc
4500 aagtttgggt cttgcgcatg tcttgcatg
4560 ttcccgccgc tttcggttac tggctcactt

taaaaacaac aaaaagaggg ggctgtttt
 aaggagacac cactacagga gtctaccgaa
 aggctggcgt cggagtcagc tacgagaatg
 gggcagccat tatgagtggg gaaggaaaat
 accgcatagc ttacggaggc ccatggagat
 tgcaagtgat cgtggtagaa ccggggaagg
 tgtttcggac ccccttcggg gaggttgggg
 ccggctcacc cattctggat tccaatggag
 agcttggcga tggctcatal gtcagcgcca
 tcccagaagc ttacactcca aacatgttaa
 accctgggtc agggaaaacc aggaaaattc
 agcgcctaag aacagctgtg ttggcaccga
 ctttgagagg gctcccagta cgataccaaa
 atgaaatagt ggatgtgatg tgccacgcca
 gagtgcccaa ctacaatctg tttgtcatgg
 tagccgcacg aggatacatc gctaccaagg
 tgacagcgac cccgcctgga accacggatc
 atttacaaga tgagatacca gacagggcat
 atgcgggtaa aaccgtgtgg tttgtggcga
 gcctccaaag agcgggaaaa aaggtcatcc
 acccaaatg taagaatgga gactgggatt

4620 gggacacgcc atccccgaaa ccttgcttaa
 4680 tcatggctag agggattctt ggcacctacc
 4740 tttccacac actatggcac acaactagag
 4800 tgacgccata ctggggtagc gtgaaagaag
 4860 ttgatcgaaa atggaatgga acagatgacg
 4920 ctgcggtaaa catccagaca aaaccaggag
 4980 ctgttagcct ggattacccg cgaggaacat
 5040 acatcatagg cctatacggc aatggagttg
 5100 tcgtgcaggg tgaccgtcag gaggaaccag
 5160 gaaagagaca gatgactgtg ttagatttgc
 5220 tgccacaaat aattaaggat gcaatccagc
 5280 cgcggtgtgt agcagcagaa atggcagaag
 5340 cttcagcagt gcagagagag caccaaggga
 5400 ctctgaccca cagattgatg tcaccgaaca
 5460 atgaagctca ttaccacgac ccagccagca
 5520 tggaattagg agaggcagca gccatcttta
 5580 cttttcccga ctcaaatgcc ccaatccatg
 5640 ggagcagtgg atacgaatgg atcacagaat
 5700 gcgtaaaaat ggggaatgag attgcaatgt
 5760 aactcaaccg caagtcctat gacacagaat
 5820 ttgtcattac caccgacatc tctgaaatgg

gggctaactt cgggtgcgagc agggtcacg
tagaagaggg agaaggcaga gtcacacctg
cagctcaacg gaggggcaga gtaggcagaa
atggaggggc taccagtga gatgacagta
tgtagacaa catacacatg cccaatgggc
aaaaggcttt cacaatggat ggccaatacc
tagagctgct taggacggct gaccttcgg
gcattcagta caccgacaga aagtgggtgtt
aggacaacac cgaggtagag atagtcaccc
gatggcttga tgcaagagta tacgcagatc
cagcaggaaa gagatcggcc gttagcttca
tcatgggaaa gacgcgggaa gctttagaca
gtgggaaggc acaccgaatg gctctcgaag
ttattgttgc catcactgta atgacaggag
gtatagggaa gatgggtctt ggagctctag
cggcagaggt tcctggaacc aaaatagcag
tggttctcat ccagaaccg gaaaaacaga
ttctcatctg cgtcttgacc gtggttggag
aaaaaaccaa agcagatctc aagagcatgt
ctggattgcc aagcatggca ctggacctgc
ggagcacagt tgtgctaacc cctcttctga

5880 actgcagaaa gagcgtgaaa cccaccatct
5940 gaaacccatc tcccataacc agtgctagcg
6000 accccaacca agttggagat gaataccatt
6060 acctagccca ttggacagag gcaaagatca
6120 tgggtggcca gctctatgga ccagagaggg
6180 gtctcagggg tgaagaaaag aaaaacttct
6240 tgtggctggc ctataagggt gcgtccaatg
6300 ttgatgggcc gcgcacgaat gccatactgg
6360 ggatgggtga gagaaagatc ctcaagccga
6420 accaagccct caagtgggtc aaagactttg
6480 tagaggtgct cggtcgcatg cctgagcatt
6540 ccatgtactt ggtcgcaacg gctgagaaag
6600 agttgccgga tgcactggaa accatcacac
6660 gattcttctt actaatgatg cagcgaaagg
6720 tgctcacgct agctaccttc ttctgtggg
6780 ggaccctgct gatcgccctg ctgctgatgg
6840 ggtcacagac agacaaccaa ctagcggtgt
6900 tgggtggcagc aaacgagtac gggatgctag
6960 ttggcggaaa gacacaggca tcaggactga
7020 gtccagccac agcctgggca ctgtatgggg
7080 agcacctgat cagtcggaa tatgtcacca

catcgctagc ctcaattaac tcacaagctg
ctttcaccca tctagacctg accgttggcc
ccctcacaac gtttttgaca gccatggttc
ctggatggca agcagaagca ctcagggctg
agaatgccgt tgttgacgga atggtcgcca
ctctgatgca aaagaaagtc ggacaggtgc
tcgtcaacc taatgtcacc actgtgagag
tcacctgtg ggataatgga gccagtgccg
gccatgtcat gcgaggtagc tacctggctg
acgtgacaa gccctccttg aaaaggggaa
ggaaggaaaa actaaatgcc atgagcagag
taatcgaggt ggaccgcact gaagcacgca
gacatccgtt ttcgagggc tcagcaaaac
cgccaatagg aaaagtcatt gatctagggt
caaccctgaa gaaggtccag gaagtcagag
agccgatgct catgcagagc tacggctgga
tgttctacaa accttcagag cctagtgaca
caagtccaga agtggaagaa caacgcacac
tgcacgagg acccagagag ttctgcataa
tagaaaaaat ggaagtcttg cagcgccgct
cccgaactc caatcacgag atgtattggg

7140 gctcattatt cgtcttgcca cgaggcgtgc
7200 tcgtcttcct tggctgctgg ggtcaaatca
7260 tggcgacact tcactatggg tacatgctcc
7320 cccagagaag gacggcggct ggaataatga
7380 ctgatgtgcc tgaactggaa aggactactc
7440 tcctcatagg ggtgagcgtg gcagcgtttc
7500 aagcaggggt gttggtgacg gcggctacgc
7560 ttitgaattc caccacagcc acgggactct
7620 gaggtcttat tgcttggact cttatcaaga
7680 ggcctggggg caggacgcta ggggagcagt
7740 aagagttttt taaataccgg agagaggcca
7800 gggctagacg tgaaaataac atagtgggag
7860 tccgttggct cgtggagaaa ggattcgtct
7920 gtgggcgtgg aggatggagc tactacgcag
7980 gatacacgaa aggtggggcg ggacatgaag
8040 acctggtctc ctitgaagagt ggagtggatg
8100 ccctgttctg tgacataggg gaatcctccc
8160 tacgcgtcct agagatgaca tccgattggt
8220 aagttctctg cccttacatg cccaaggcca
8280 tcggaggtgg gctagtacgt ctccccctgt
8340 ttagtgagac cgctggcaat gtggtgcacg

ctgtgaacat gaccagccag gtactactgg
caaagtatga ggaagatgtc aacctaggta
ttcatagcaa tcaggagaaa atcaagaaga
caacgtggca caaagaccct gaacacccat
aggtgaaggc tactggctca gccagctctc
aaccttggga cgccattgcc aacgtcacca
gacagcaaag agttttcaag gagaaagttg
tcaaggaagt gctcaacgag accaccaact
gaccccgtt gtgcaccaag gaagaattta
gagcagtgtt tgctgaacag aatcaatgga
ggttttggga gatggtcaat gaagagaggg
gtatctacaa catgatggga aaaagagaga
ggagcagggc catttggttc atgtggcttg
ggttcctgaa tgaagaccac tggctgagcc
caggcgtcca aaagttggga tacatcctcc
tgtacgtga tgacaccgcc gggtgggaca
aagctaaggt gctggagctc ctagatggtg
aactgactta caggcacaaa gtggtcaagg
tgatggacgt gatatcaaga gaagacaaaa
tcaacacttt cacgaacatc gctgtccagc
ttgggccaca acacttggaa cagctgccta

8400 ggcgaatgga tcgcacagtg tggagagggc
8460 gcggaacaag agccgtggga aagggagaag
8520 gaatccagaa gcttaaagaa gaattcgcca
8580 accgcacttg gacataccac ggaagctatg
8640 tcgtcaacgg agtgggtgaag ctcatgagta
8700 ccatggccat gactgacacc accccttttg
8760 acacgaaagc tcttgagcca ccagctggag
8820 ggctgtgggc ccacttgtca cgggaaaaaa
8880 taaagaaagt caatagcaac gcggctcttg
8940 gcacggcgcg tgaggctgtg gacgaccgcg
9000 aaaaccatct gcgaggagag tgtcacacat
9060 agaagcctgg agagtttggga aaagctaaag
9120 gagcacggta tctagagttt gaagctttgg
9180 gagagaattc aggaggtgga gtagaaggct
9240 gtgacatagc aggaaagcaa ggagggaaaa
9300 ctagaattac tagaactgat ttagaaaatg
9360 aacaccgcat gctcgcccgg gccataattg
9420 tcatgagacc tgcagcagaa ggaaagaccg
9480 gggggagtgg acaggtggtc acttatgctc
9540 tcgttaggct gatggaggct gagggggtca
9600 ggaaaaacaa gatagctgtc aggacttggc

tctttgagaa tggagaggag agagtgacca
 tcaagccgct ggacgacaga ttgccacgg
 ttagaaaaga catccaggaa tggaagcctt
 cttctgctc taaccacttt caggagattg
 cgtgcagagg acaggatgag ctgataggca
 atgtgaagga cacagcttgc ctggcaaaag
 tccatcgtag ggacctgcgt ctcatggcaa
 ggggtgccac aggcaggaca tcctggtcaa
 aagacatgct gcaggtctgg aacagagtct
 agactcccgt cacaagctgg acagacgttc
 gtggcagcct catcggaacg cgttccagag
 taaaccaggt tagagctgtc attgggaaag
 ggagatacga agacgtcttg atccaggaag
 aatgtaaata atgtgaatga gaaaatgcat
 accggatact gggtagacgg tgctgcctgc
 atctgacaac agaaagttag aaagccctca
 tggaagtga aagaccaacg tcaggccacg
 ctgcgagcc ccaggaggac tgggttacca
 cgtctaggat gcaatagacg aggtgtaagg
 aacaacatgc ggccaagcc ccctgaagc
 aggagacccc gcatttgcac caaacagcat

9660 ggatggcgat cagcggagac gactgtgtcg
 9720 ccctccattt cctcaacgca atgtcaaagg
 9780 cgcacggctg gcacgattgg cagcaagttc
 9840 tgatgaaaga cggaaggagt atagtgtcc
 9900 gggctcgcat ctctccagga gctggatgga
 9960 catatgcaca gatgtggcta ctctatact
 10020 atgcgatttg ctcagcagtg ccagtggatt
 10080 tacactcgaa aggagagtgg atgaccacgg
 10140 ggattgaaga aaatgaatgg atgatggata
 10200 cgtatgtggg aaagcgtgag gacatctggt
 10260 caacctgggc tgagaacatc tatgcggcga
 10320 aaaattatgt tgactacatg acctcactca
 10380 acagggtcat ctagtgtgac ttaaggtaga
 10440 gtatatggag tcaggccagc aaaagctgcc
 10500 gtctcagtcc caggaggact gggtaacaa
 10560 gaaccgtctc ggaagtaggt ccctgctcac
 10620 aatttgtgcc actccgctgg ggagtgcggc
 10680 aagccgttga ggccccacg gccaagcct
 10740 actagagggt agaggagacc ccgtggaaac
 10800 tgtagaggag gtggaaggac tagaggttag
 10860 attgacacct gggaatagac tgggagatct

tctgctctat ctcaacatca gctactaggc
 aggaagaaca caggatctcg agcggccgcg
 agagggattt gttccctagg cctaattatt
 ccttttctaa ttctcgtata ctatagttag
 caattctcat gtttgacagc ttatcatcga
 tattcaggcg tagcaaccag gcgtttaagg
 cccgccctgc cactcatcgc agtactgttg
 gccatcacia acggcatgat gaacctgaat
 cgtataatat ttgcccatgg tgaaaacggg
 taaatcaaaa ctggtgaaac tcaccaggg
 aaacccttta gggaaatagg ccaggttttc
 gtgtagaaac tgccggaaat cgtcgtggta
 ttgctcatgg aaaacggtgt aacaagggtg
 tttcattgcc atacggaatt ccggatgagc
 ggccggataa aacttgtgct tatttttctt
 ctgaacggtc tggttatagg tacattgagc
 acgatgccat tgggatatat caacggtggt
 ttccttagct cctgaaaatc tcgataactc
 attatggtga aagttggaac ctcttacgtg
 ggcccagggc ttcccgggat caacagggac
 ttccgtcaca ggtatttatt cgcgataagc

10920 acagagcgcc gaagtatgta gctggtggtg
 10980 gaccgactag cctcttttcg gccttcgctg
 11040 atttttaatt gcccaatacg tatacgagt
 11100 tcgtattatc tagccgcccg ggccgtcgac
 11160 atttctgcca ttcatccgct tattatcact
 11220 gcaccaataa ctgccttaaa aaaattacgc
 11280 taattcatta agcattctgc cgacatggaa
 11340 cgccagcggc atcagcacct tgtcgccctg
 11400 ggcaagaag ttgtccatat tggccacgtt
 11460 attggctgag acgaaaaaca tattctcaat
 11520 accgtaacac gccacatctt gcgaatatat
 11580 ttcactccag agcgtatgaaa acgtttcagt
 11640 aacactatcc catatcacca gtcaccgtc
 11700 attcatcagg cgggcaagaa tgtgaataaa
 11760 tacggtcttt aaaaaggccg taatatccag
 11820 aactgactga aatgcctcaa aatgttcttt
 11880 atatccagtg atttttttct ccatittagc
 11940 aaaaaatagc cccggtagtg atcttatctc
 12000 ccgatcaacg tctcattttc gccaaaagtt
 12060 accaggattt atttattctg cgaagtgatc
 12120 tcatggagcg gcgtaaccgt cgcacaggaa

ggacagagaa agcgcggatc tgggaagtga
aggcggttgc cgccgctgct gctgacggtg
cgttccgcca ttcctatgcg atgcacatgc
aaagcctgat gggacataag tccatcagtt
tggatgtggc tgcccggcac cgggtgcagt
tgctgaaaca attatcctga gaataaatgc
gtggatatgc tgtttttgtc tgttaaacag
acgaaacagt cgggaaaatc tcccattatc
ctgtgtagcg tttataggaa gtagtgttct
gatttgaata tgccttcagg aacaatagaa
cggattatgt cagcaatgga cagaacaacc
ccttttacag ccagtagtgc tcgccgcagt
gaggaagcac cagggaacag cacttatata
tcccttgggg ttatccactt atccacgggg
ttagatcttc ttttttagag cgccttgtag
gttgtgacaa attgcccttt cagtgtgaca
acaaattgcc cttaaccttg tgacaaattg
tatccctgct tattgactct tttttattta
acatggatct gtcatggcgg aaacagcgg
gcgaatcgtc cagtcaaacg acctcactga
acgtatgctg tatctgttcg ttgaccagat

12180 cggacagAAC ggtcaggacc tggattgggg
12240 tgacgttctc tgttccggtc acaccacata
12300 tgtatgccgg tataccgctg aaagttctgc
12360 caacggaagt ctacacgaag gtttttgcgc
12420 ttgcgatgcc ggagtctgat gcggttgcga
12480 cttggccttt atatggaaat gtggaactga
12540 agaagctggc tgttatccac tgagaagcga
12600 gtagagatcc gcattattaa tctcaggagc
12660 gtcatgatgc ctgcaagcgg taacgaaaac
12720 atcttcgtgc ggtgttacgt tgaagtggag
12780 taatgaacac agaaccatga tgtggtctgt
12840 cgagcgacag ggccaagccc tcgagtgagc
12900 ttctgcttac acacgatgcc tgaaaaaact
12960 atatttttat aattattttt tttatagttt
13020 gcctttatcc atgctggttc tagagaaggt
13080 aatcacctc aaatgacagt cctgtctgtg
13140 ccctcagaag aagctgtttt ttcacaaagt
13200 gtgtgacaat ctaaaaactt gtcacacttc
13260 tatcaatcac aagaaacgta aaaatagccc
13320 ggcggcatat agtctctccc gggatcaaaa
13380 cagaaaatct gatggcacc tacaggaaca

tgacggtatc tgcgagatcc atgttgctaa
 ggaagccagt aaggatatac ggcaggcatt
 ttatcgccct gaagaggatg ccggcgatga
 caaacgtgcg cacagtccat ccagagggt
 tcccttcttt atcgggttac agaaccggtt
 aatcaccaat ccgtatgcca tgcgtttata
 tggctcaggc atcgtctctc tgaaaatcga
 aagttaccag cgtatgcctg acttccgccg
 caacagcaga actccaatgc gcctctcata
 tcatatcgta ttttccttcc gcgatatcac
 tctgtcacag atttgagggt ggttcgtcac
 cacagttttg ctgtttcctt cagcctgcat
 ttaaggaag ccaaatttga gggcagtttg
 tcatgtgacc tgatatcggg ggtagttcg
 ttattactct gaattggcta tccgcgtgtg
 atatttcttc ttgcgctgag cgtaagagct
 cgccagttcg ctcgctatgc tccggttacac
 actgaggtat gtgctcttct tatctccttt
 gcggtttttt gatgactttg cgattttgtt
 aaaaaaacgc aaagcaatga ttaaaggatg
 cagtgcataa acgctggica tgaaatgacg

13440 atatgctgaa atattcggat tgacctctgc
 13500 gaagagtttc gcggggaagg aagtggtttt
 13560 aaaaggctat gaatcttttc cttggtttat
 13620 ttacagtgtg catatcaacc catatctcat
 13680 tacgcagttt cggcttagtg aaacaaaaga
 13740 cgaatccctg tgtcagtatc gtaagccgga
 13800 ctggatcata gagcgttacc agctgcctca
 13860 ccgcttcctg caggtctgtg ttaatgagat
 13920 cattgagaaa aagaaaggcc gccagacgac
 13980 ttccatgacg acaggatagt ctgagggtta
 14040 atttgttctg acctactgag ggtaatttgt
 14100 ggattttctc atactttttg aactgtaatt
 14160 tcacagttga tttccttctc tttcccttcg
 14220 tcatcattga tgagggttga ttatcacagt
 14280 tacctctacc tggagttttt cccacggtgg
 14340 atctgacaga acagttcttc ttgcttcct
 14400 ggctgcggcg agcgctagtg ataataagtg
 14460 tgtagtgttg ctcttatitt aaacaacttt
 14520 gttgctttgc agtaaattgc aagatttaat
 14580 ttcagaatga aactcatgga aacacttaac
 14640 aaggctatcg ccattgcaca gttaaatgat

gacagcccgg aagcgaggaa aataaccgg
 gttggggttt cttctcaggc tatcagagat
 gatatggaaa ttcgaggacg gggttagcaa
 catatgcgtg atgtgtttgg tacgcgattg
 atcgggggtt ctgccataa aggtggcggt
 caggatctgg ctctgaagg gctacgtgtt
 acagcctcaa tgtatcacgg atgggtacca
 ctgcctttct atcttgggga aaaggacgat
 ccggggcttg acattattcc ttcctgtctg
 ggcaaatttg atgaaggtaa actgccacc
 gaaactgttg ctcatgacta tgatgtcata
 ggcacgatta atgtcgtatg tgctgctgat
 tttgactaca cctccgcact gcagttttc
 gatcttaaag gggtcgagcc tgatgtacgt
 ggctctcagt ccccgtaggag ggaggagcaa
 aaaaatgttg tacgtgaaac ggatgaagtt
 tttgaacagg ccattgatca acgctcttca
 tgggaacctg tctgcaatga aattttcgat
 taatgaagcg tgcgcctgtt attccaaaac
 cttcgttatc gacaccagct gccccgatgg
 tggctcgcgg taatgccatt actttgcctg

14700 cgctggagaa taggtgaagc agcggattta
 14760 gccgagaaag cagggcgact accgcacccg
 14820 cgtgttgggt atacaattga acaaattaat
 14880 cgacgtgctg aagacgtatt tccaccggtg
 14940 tacaaaacct cagtttctgt tcatcttgct
 15000 ttgctcgtgg aaggtaacga cccccaggga
 15060 gatcttcata ttcatgcaga agacactctc
 15120 gtcacttatg caataaagcc cacttgctgg
 15180 gctctgcacc gtattgaaac tgagttaatg
 15240 gatccacacc tgatgctccg actggccatt
 15300 gttattgaca gcgcgcctaa cctgggtatc
 15360 gtgctgattg ttcccacgcc tgctgagttg
 15420 gatatgcttc tgatctgct caagaacgtt
 15480 attttgctta ccaaatacag caatagtaat
 15540 attcgggatg cctggggaag catggttcta
 15600 ggtaaaggct agatccggat gagaactgtt
 15660 actggcgcct ggagaaatgc tctttctatt
 15720 cgtctgatta aaccacgctg ggagattaga
 15780 atacgtcaa tactcaaccg gttgaagata
 15840 tggattcggt aattgcgcgc gtaggagtaa
 15900 tatgtggctg ggatgtgaag tttactcttg

aagtgtccg gggatagat gttgagaaga
 accaggagct gcttactgag gacgcactgg
 gtcaacagac accggcggttc ggtcgaagag
 gtgcgcgtcg taaagctgct gcacttacg
 tggatgatga gcagatggct gcattatcca
 cttatgaacg tggtcagcgt tatgcaagcc
 ctgcgctggc tgatgcggaa aatatttcac
 ccaaattgcc taaatcagtt gttgctcttt
 caggtgatgc acttcaaaaa gcctttacag
 ctaaccttca tgagcagaaa aaagctgggg
 ttttaacttc tgtgcttaaa acgtcatctg
 agtttgctcc tggagcgaca gtattgtata
 ggtctcgtgt tccaactgag tgtatagaga
 agccagcacc ctgatgcgac cacgttttag
 tttgttacag gccagaaaagc ataactggcc
 ttgtatcgtc ggtctgataa tcagactggg
 ttattagtct gggaccacgg tccactcgt
 cggcccact cgtatcgtcg gtctgataat
 tcggtctgat tattagtctg ggaccatgg
 ctgggaccac ggtcccactc gtatcgtcgg
 ctctatcgt cggctctgatt attagtctgg

15960 cctctcgggt atggtcaggt aatgaacgtg
 16020 atgatctcat ccttctttt ctactgactg
 16080 tatctggtgt catagaaatt gccgatggga
 16140 aaagtgatta tcgtgttctg gttggcgagc
 16200 gattgggtaa cgattatcg ccaacaagtg
 16260 gattgcagaa tgaatttgct ggaaatatit
 16320 gtaagattat taccgctgt atcaacaccg
 16380 tttctcacc cggatgaacta tctgcccgg
 16440 ataaagagga attacttaag cagcaggcat
 16500 tgatatttga agctgaagaa gttatcactc
 16560 catcaagaac tagtttaagc tcacgacatc
 16620 agggcgataa aatggtgctt aacctggaca
 16680 aaattgaggc cattcttaag gaacttgaaa
 16740 tctacgttta tctgtcttta cttaatgtcc
 16800 tgaatattct ctctgggccc actgttccac
 16860 accacggctc cactcgtatc gtcggtctga
 16920 atcgtcgtc tgattattag tctgggacca
 16980 cagactggga ccacggctcc actcgtatcg
 17040 cccactcgta tcgtcgtct gattattagt
 17100 tctgattatt agtctggaac cacgggtcca
 17160 gaccacggtc ccactcgtat cgtcggctctg

attattagtc tgggaccacg atcccactcg
acgggccac ttgtattgtc gatcagacta
tgtcaagggc aagtattgac atgtcgtcgt
ggttgtatgc ctgctgtgga ttgctgctgt
gttatgtgga caaaatacct ggttaccag
cgatgcaagt gtgtcgtgt cgacgagctc
cagtgtcgt gatttgtatt gtctgaagtt
aatacgatac ctgcgtcata attgattatt
gtgatatgta gatgataatc attatcactt
acggggcggc gacctcgcg gttttcgcta
ccgttcttct tcgtcataac ttaatgtttt
acgacaggtg ctgaaagcga gctttttggc
gtggaatgaa caatggaagt ccgagctcat
cgaagttata ttcgatgcgg cgctgaggtc
accaggcctg aatcgcccca tcatccagcc
ctttgttgta ggtggaccag ttggtgattt
cgttgtcggg aagatgcgtg atctgacct
aaagccacgt gtctcaaaat ctctgatgtt
gaacaataaa actgtctgct tacataaaca
aacgggaaac gtcttgctcg acgatgataa
atgctaaaac gcggcatacc ccgcgtattc

17220 tgttgtcggc ctgattatcg gtctgggacc
17280 tcagcgtgag actacgattc catcaatgcc
17340 aacctgtaga acggagtaac ctcggtgtgc
17400 gtcctgctta tccacaacat tttgcgcacg
17460 gccgtgccgg cacgttaacc gggctgcatc
17520 gcgagctcgg acatgaggtt gccccgtatt
17580 gtttttacgt taagttgatg cagatcaatt
17640 tgacgtgggt tgatggcctc cacgcacgtt
17700 tacgggtcct ttccggtgat ccgacaggtt
17760 tttatgaaaa tttccggtt taaggcgttt
17820 tatttaaaat accctctgaa aagaaaggaa
17880 ctctgtcgtt tcctttctct gttttgtcc
17940 cgctaataac ttcgtatagc atacattata
18000 tgcctcgtga agaaggtgtt gctgactcat
18060 agaaagtgag ggagccacgg ttgatgagag
18120 tgaacttttg ctttgccacg gaacggtctg
18180 tcaactcagc aaaagttcga tttattcaac
18240 acattgcaca agataaaaaat atatcatcat
18300 gtaataacaag ggggtgttatg agccatattc
18360 gctgtcaaac atgagaattg ggtcgtcaat
18420 ccactagtta atcgtacgaa ttccgtatgg

caatgaaaga cggtgagctg gtgatatggg	18480 atagtgttca cccttgttac accgttttcc
atgagcaaac tgaaacgttt tcatcgctct	18540 ggagtgaata ccacgacgat ttccggcagt
ttctacacat atattcgcaa gatgtggcgt	18600 gttacgggtga aaacctggcc tatttcctta
aagggtttat tgagaatatg tttttcgtct	18660 cagccaatcc ctgggtgagt ttcaccagtt
ttgatttaaa cgtggccaat atggacaact	18720 tcttcgcccc cgttttcacc atgggcaaatt
attatacgca aggcgacaag gtgctgatgc	18780 cgctggcgat tcaggttcat catgccgttt
gtgatggctt ccatgtcggc agaattgctta	18840 atgaattaca acagtactgc gatgagtggc
agggcggggc gtaatTTTTT taaggcagtt	18900 attggtgccc ttaaaccgct ggttgctacg
cctgaataag tgataataag cggatgaatg	18960 gcagaaattc gatgataagc tgtcaaacat
gagaattggt cgacggcccg ggcggttaga	19020 taatacgact cactatag

19038 <210> 47 <211> 19038 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <

223> sequence for pBACT7/JVFLx/XhoI <400> 47 agaagtttat ctgtgtgaac ttcttggctt

agtatcgttg agaagaatcg agagattagt	60 gcagttttaa cagtttttta gaacggaaga
taaccatgac taaaaaacca ggagggcccg	120 gtaaaaaccg ggctatcaat atgctgaaac
gcggcctacc ccgcgtattc ccactagtgg	180 gagtgaagag ggtagtaatg agcttgttgg
acggcagagg accagtacgt ttcgtgctgg	240 ctcttatcac gttcttcaag ittacagcat
tagccccgac caaggcgctt ttaggccgat	300 ggaaagcagt ggaaaagagt gtggcaatga
aacatcttac tagtttcaaa cgagaacttg	360 gaacactcat tgacgccgtg aacaagcggg
gcagaaagca aaacaaaaga ggaggaaatg	420 aaggctcaat catgtggctc gcgagtttgg
cagttgtcat agcttgtgta ggagccatga	480 agttgtcaaa tttccaaggg aagcttttga
tgaccattaa caacacggac attgcagacg	540 tcatcgatgat tcttacctca aaaggagaga

acagatgctg ggtccgggca atcgatgtcg
aatgtcctaa gcttaccatg ggcaatgatc
aagaagtcta cgtccaatat ggacggtgca
ggtccgtgtc ggtccaaaca catggggaga
tggattcaac gaaagccaca cgatatctca
ctggctatgc tttcctggcg gcggtacttg
gcgtgggtgtt taccatcctc ctgctgttgg
gaatgggcaa ccgtgacttc atagaaggag
tagaaggaga tagctgcttg acaatcatgg
tgattaacat cgaagccagc caacttgctg
tcactgacat ctcgacggtg gctcggtgcc
gagctgatag tagctatgtg tgcaaacaag
gtggactttt cgggaaggga agcattgaca
cgattgggag aacaatccag ccagaaaaca
gaaccaccac ctcggaaaac catgggaatt
caaagtittac agtaacaccc aatgctcctt
aagtcacact ggactgtgaa ccaaggagtg
ccgtgggggtc aaagtcattt ctggtcata
ggacgtcccc ttcgagcaca gcgtggagaa
cgcacgccac aaaacagtcc gttgttgctc
cgctggcagg agccatcgtg gtggagtact

600 gctacatgtg tgaggacact atcacgtacg
660 cagaggatgt ggattgctgg tgtgacaacc
720 cgcggaccag gcattccaag cgaagcagga
780 gttcactagt gaataaaaaa gaggcttggc
840 tgaaaactga gaactggatc ataaggaatc
900 gctggatgct tggcagtaac aatggtaac
960 tcgctccggc ttacagtttt aattgtctgg
1020 ccagtggagc cacttgggtg gacttagtgc
1080 caaacgacaa accaacattg gacgtccgca
1140 aggtcagaag ctactgctat catgcttcag
1200 ccacgactgg agaagcccac aacgagaagc
1260 gtttcactga tcgtgggtgg ggcaacggat
1320 catgtgcaaa attctcctgc accagtaagg
1380 tcaaatacga agttggcatt tttgtgcatg
1440 attcagcgca agtaggggcg tcccaggcgg
1500 cgataaccct caaacttggg gactacggag
1560 gactgaacac tgaagcgttt tacgtcatga
1620 gggaatggtt tcatgacctc gctctccct
1680 acagagaact cctcatggaa ttgaagagg
1740 ttgggtcaca ggaaggaggc ctccatcagg
1800 caagctcagt gaagttaaca tcaggccacc

tgaaatgtag gctgaaaatg gacaaactgg
 cagaaaaatt ctcttgcg aaaaatccgg
 aactctccta ttctgggagt gatggcccct
 tcaatgacat gacccccgtt gggcggctgg
 gtgccaactc aaaggtgctg gtcgagatgg
 ttggaagggg agacaagcag atcaaccacc
 aggcTTTTTc aacaactttg aaggagctc
 gggactttgg ctctattgga ggggtcttca
 ttggtggcgc tticagaaca ctctttggg
 gtgccctact actctggatg ggcatcaacg
 tggccacagg aggtgtgctc gtgttcttag
 ccattgacat cgcaagaaaa gagatgagat
 tggaagcctg ggtggatagg tataaatatt
 tcgtccacaa agcgcacaag gaaggcgtgt
 accaaatgtg ggaagccgtg cgggacgaat
 acctcagtgt ggttgtgaac aagcccgtgg
 ccatgacgca agagaagttt gaaatgggct
 ccccggaatt ggctaactcc acatttgttg
 atgagcacag agcctggaac agcatgcaaa
 cccgtgtgtg gctgaagatt agagaggaaa
 gcacagctgt caaaggacat gtggcagttc

1860 ctctgaaagg cacaacctat ggcatgtgta
 1920 cggacactgg ccacggaaca gttgtcattg
 1980 gcaaaattcc gattgtctcc gttgcgagcc
 2040 tgacagtga ccccttcgtc gcgacttcca
 2100 aacccccctt cggagactcc tacatcgtag
 2160 attggcataa agctggaagc acgtgggca
 2220 aaagactggc agcgttgggc gacacagcct
 2280 actccatagg aaaggccgtt caccaagtgt
 2340 gaatgtcttg gatcacacaa gggttaatgg
 2400 cacgagatcg atcaattgct ttggccttct
 2460 cgaccaatgt gcatgctgac actggatgtg
 2520 gcggaagtgg catcttcgtg cacaacgacg
 2580 tgccagaaac gccagatcc ctagcgaaga
 2640 gcggagtcag atctgtcact agactggagc
 2700 tgaacgtcct gctcaaagag aatgcagtgg
 2760 ggagatatcg ctgagcccca aaacgcctgt
 2820 ggaaagcatg gggaaaaagc attctctttg
 2880 tagatggacc tgagacaaag gaatgtcctg
 2940 tcgaagactt cggctttggt atcacatcaa
 3000 gcactgacga gtgtgatgga gcgatcatag
 3060 atagtgactt gtcgtactgg attgagagtc

gctacaacga cacatggaaa cttgagaggg
ggccagagac acacactctt tggggagatg
ataccatagc cggaccaaaa agcaagcaca
agggaccttg ggacgaaaac ggcatagtct
tcaccatcac agaggattgt ggcaagagag
gaaagttgat tactgactgg tgctgtcgca
cagaaaatgg ctgctggtac ggaatggaaa
tcgtcagatc acaggttgat gctttcaatg
ttctggtgat gtttctggcc acccaggagg
ccattcctgc ggttttgggg gccctgcttg
atttggcgag gtatgtggtg ctagtcgctg
acgtcctgca ccttgctttg attgccgttt
acatgcttag cacgagatgg acgaaccaag
tctttcaatt ggcctcagta gatctgcaaa
ctatagcatg gatgattgtt cgagcgatca
cagtcttagc gcttctaact ccgggaatga
tccttctcgt catagggatt tgctccctgc
agaaaggagc tgtactcttg ggcttagcgc
ccatagctgc tggactaatg gtctgcaacc
agtttctgtc ggcagtcgga ttgatgtttg
ttgaatccat gtcaataccc ttcatgctgg

3120 cagtctttgg agagggtcaaa tcttgcaactt
3180 gtgttgagga aagtgaactc atcatcccg
3240 atcggaggga aggtacaaa acacaaaacc
3300 tggactttga ttattgccca gggacaaaag
3360 gcccttcggt cagaaccact actgacagtg
3420 gttgctccct tccgcccta cgattccgga
3480 tcagacctgt taggcatgat gaaacaacac
3540 gtgaaatggg tgaccctttt cagctgggccc
3600 tccttcgcaa gaggtggacg gccagattga
3660 tgctgatgct tgggggcatc acttacactg
3720 ctgctttcgc agaggccaat aatggaggag
3780 ttaagatcca accagctttt ctagtgatga
3840 aaaacgtggg cctggtccta ggggctgcct
3900 tcggagtcca cggaatcctg aatgccgccg
3960 ccttccccac aacctcctcc gtcaccatgc
4020 gggctctata cctagacact tacagaatca
4080 tgcaagagag gaaaaagacc atggcaaaaa
4140 tcacatccac tggatggttc tcgccacca
4200 caaacaagaa gagagggtgg ccagctactg
4260 ccatcgtagg tggtttggcc gatttgata
4320 caggtcttat ggcagtgtcc tacgtagtgt

caggaaaaagc aacagatatg tggctcgaac
 ctgcaatcac aggaagcagt cggaggctgg
 acttgattga tgatcccggc gttccatgga
 gcttagccgc cctcacgcct tgggccattg
 taaaaacaac aaaaagaggg ggcgtgtttt
 aaggagacac cactacagga gtctaccgaa
 aggctggcgt cggagtcatg tacgagaatg
 gggcagccat tatgagtgga gaaggaaaat
 accgcatagc ttacggaggc ccatggagat
 tgcaagtgat cgtggtagaa ccggggaagg
 tgtttcggac ccccttcggg gaggttgggg
 ccggctcacc cattctggat tccaatggag
 agcttggcga tggctcatac gtcagcgcca
 tcccagaagc ttacactcca aacatgttaa
 accctggttc agggaaaacc aggaaaattc
 agcgcctaag aacagctgtg ttggcaccga
 ctttgagagg gctcccagta cgatacaaaa
 atgaaatagt ggatgtgatg tgccacgcca
 gagtgcccaa ctacaatctg tttgtcatgg
 tagccgcacg aggatacatc gctaccaagg
 tgacagcgac cccgcctgga accacggatc

4380 gggccgccga catcagctgg gagatggatg
 4440 atgtgaaact ggatgatgac ggagattttc
 4500 aagtttgggt cttgcgcatg tcttgcatg
 4560 ttcccgccgc ttccggttac tggctcactt
 4620 gggacacgcc atccccgaaa ccttgcttaa
 4680 tcatggctag agggattctt ggcacctacc
 4740 tttccacac actatggcac acaactagag
 4800 tgacgccata ctggggtagc gtgaaagaag
 4860 ttgatcgaaa atggaatgga acagatgacg
 4920 ctgcggtaaa catccagaca aaaccaggag
 4980 ctgttagcct ggattacccg cgaggaacat
 5040 acatcatagg cctatacggc aatggagttg
 5100 tcgtgcaggg tgaccgtcag gaggaaccag
 5160 gaaagagaca gatgactgtg ttagatttgc
 5220 tgccacaaat aattaaggat gcaatccagc
 5280 cgcgggtggt agcagcagaa atggcagaag
 5340 cttcagcagt gcagagagag caccaaggga
 5400 ctctgacca cagattgatg tcaccgaaca
 5460 atgaagctca tttaccgac ccagccagca
 5520 tggaattagg agaggcagca gccatcttta
 5580 cttttcccga ctcaaagcc ccaatccatg

atttacaaga tgagatacca gacagggcat
 atgcgggtaa aaccgtgtgg tttgtggcga
 gcctccaaag agcgggaaaa aaggtcatcc
 acccaaaatg taagaatgga gactgggatt
 gggctaactt cgggtcgcgagc agggtcacgc
 tagaagaggg agaaggcaga gtcacccctc
 cagctcaacg gaggggcaga gtaggcagaa
 atggaggggc taccagtga gatgacagta
 tgtagacaa catacacatg cccaatgggc
 aaaaggcttt cacaatggat ggccaatacc
 tagagctgct taggacggct gaccttcgg
 gcattcagta caccgacaga aagtgggtgtt
 aggacaacac cgaggtagag atagtcaccc
 gatggcttga tgcaagagta tacgcagatc
 cagcaggaaa gagatcggcc gttagcttca
 tcatgggaaa gacgcgggaa gctttagaca
 gtgggaaggc acaccgaatg gctctcgaag
 ttattgttgc catcactgta atgacaggag
 gtatagggaa gatgggtctt ggagctctag
 cggcagaggt tcctggaacc aaaatagcag
 tggttctcat cccagaaccg gaaaaacaga

5640 ggagcagtgg atacgaatgg atcacagaat
 5700 gcgtaaaaat ggggaatgag attgcaatgt
 5760 aactcaaccg caagtcctat gacacagaat
 5820 ttgtcattac caccgacatc tctgaaatgg
 5880 actgcagaaa gagcgtgaaa cccaccatct
 5940 gaaacccatc tcccataacc agtgctagcg
 6000 accccaacca agttggagat gaataccatt
 6060 acctagccca ttggacagag gcaaagatca
 6120 tgggtggcca gctctatgga ccagagaggg
 6180 gtctcagggg tgaagaaaag aaaaacttct
 6240 tgtggctggc ctataaggtg gcgtccaatg
 6300 ttgatgggcc gcgcacgaat gccatactgg
 6360 ggatgggtga gagaaagatc ctcaagccga
 6420 accaagccct caagtggttc aaagactttg
 6480 tagaggtgct cggtcgcatg cctgagcatt
 6540 ccatgtactt ggtcgcaacg gctgagaaaag
 6600 agttgccgga tgcactggaa accatcacac
 6660 gattcttcct actaatgatg cagcgaaagg
 6720 tgctcacgct agctaccttc ttctgtggg
 6780 ggaccctgct gatcgccctg ctgctgatgg
 6840 ggtcacagac agacaaccaa ctagcggtgt

ttctcatctg cgtcttgacc gtggttgag
aaaaaaccaa agcagatctc aagagcatgt
ctggattgcc aagcatggca ctggacctgc
ggagcacagt tgtgctaacc cctcttctga
catcgctagc ctcaattaac tcacaagctg
ctttcaccga tctagacctg accgttggcc
ccctcacaac gtttttgaca gccatggttc
ctggatggca agcagaagca ctcagggtg
agaatgccgt tgttgacgga atggtcgcca
ctctgatgca aaagaaagtc ggacaggtgc
tcgtcaacc taatgtcacc actgtgagag
tcaccttgtg ggataatgga gccagtgccg
gccatgtcat gcgaggtagc tacctggctg
acgtgacaa gccctccttg aaaaggggaa
ggaaggaaaa actaaatgcc atgagcagag
taatcgaggt ggaccgcact gaagcacgca
gacatccggt ttcgcgaggc tcagcaaaac
cgccaatagg aaaagtcatt gatctagggt
caaccctgaa gaaggtccag gaagtcagag
agccgatgct catgcagagc tacggctgga
tgttctacaa accttcagag cctagtgaca

6900 tggatggcagc aaacgagtac gggatgctag
6960 ttggcggaaa gacacaggca tcaggactga
7020 gtccagccac agcctgggca ctgtatgggg
7080 agcacctgat cacgtcgga tatgtcacca
7140 gctcattatt cgtcttgcca cgaggcgtgc
7200 tcgtcttctt tggctgctgg ggtcaaatca
7260 tggcgacact tcactatggg tacatgctcc
7320 cccagagaag gacggcggct ggaataatga
7380 ctgatgtgcc tgaactggaa aggactactc
7440 tcctcatagg ggtgagcgtg gcagcgtttc
7500 aagcaggggt gttggtgacg gcggctacgc
7560 tttggaattc caccacagcc acgggactct
7620 gaggtcttat tgcttggact cttatcaaga
7680 ggcctggggg caggacgcta ggggagcagt
7740 aagagttttt taaataccgg agagaggcca
7800 gggctagacg tgaaaataac atagtgggag
7860 tccgttggtc cgtggagaaa ggattcgtct
7920 gtgggcgtgg aggatggagc tactacgcag
7980 gatacacgaa aggtggggcg ggacatgaag
8040 acctggtctc cttgaagagt ggagtggatg
8100 ccctgttctg tgacataggg gaatcctccc

caagtccaga agtggagaa caacgcacac
tgcacgagg acccagagag ttctgcataa
tagaaaaaat ggaagttctg cagcgccgct
cccgaaactc caatcacgag atgtattggg
ctgtgaacat gaccagccag gtactactgg
caaagtatga ggaagatgtc aacctaggta
ttcatagcaa tcaggagaaa atcaagaaga
caacgtggca caaagaccct gaacacccat
aggtgaaggc tactggctca gccagctctc
aaccttggga cgccattgcc aacgtcacca
gacagcaaag agttttcaag gagaaagttg
tcaaggaagt gctcaacgag accaccaact
gaccccgttt gtgcaccaag gaagaattta
gagcagtgtt tgctgaacag aatcaatgga
ggttttggga gatggatcaat gaagagaggg
gtatctacaa catgatggga aaaagagaga
ggagcagggc catttggttc atgtggcttg
ggttcctgaa tgaagaccac tggtgagcc
caggcgcca aaagtggga tacatcctcc
tgtacgtga tgacaccgcc gggtgggaca
aagctaaggt gctggagctc ctagatgggtg

8160 tacgcgtcct agagatgaca tccgattggt
8220 aagttctctg cccttacatg cccaaggtca
8280 tcggaggtgg gctagtacgt ctccccctgt
8340 ttagtggagc cgctggcaat gtggtgcacg
8400 ggcaatgga tcgcacagtg tggagagggc
8460 gcggaacaag agccgtggga aaggagagaag
8520 gaatccagaa gcttaaagaa gaattcgcca
8580 accgcacttg gacataccac ggaagctatg
8640 tcgtcaacgg agtggatgaag ctcatgagta
8700 ccatggccat gactgacacc accccttttg
8760 acacgaaagc tcctgagcca ccagctggag
8820 ggctgtgggc ccacttgtca cgggaaaaaa
8880 taaagaaagt caatagcaac gcggctcttg
8940 gcacggcgcg tgaggctgtg gacgaccgcg
9000 aaaaccatct gcgaggagag tgtcacacat
9060 agaagcctgg agagtttggga aaagctaaag
9120 gagcacggtg tcttgagttt gaagcttttg
9180 gagagaattc aggaggtgga gtagaaggct
9240 gtgacatagc aggaaagcaa ggaggga
9300 ctagaattac tagaactgat ttagaaaatg
9360 aacaccgcat gctcgcccg gccataattg

aactgactta caggcacaaa gtggtcaagg
tgatggacgt gatatcaaga gaagaccaaa
tcaacacttt cacgaacatc gctgtccagc
ttgggccaca acacttgga cagctgccta
tctttgagaa tggagaggag agagtgacca
tcaagccgct ggacgacaga ttcgccacgg
ttagaaaaga catccaggaa tggaagcctt
ccttctgctc taaccacttt caggagattg
cgtgcagagg acaggatgag ctgataggca
atgtgaagga cacagcttgc ctggcaaaag
tccatcgtag ggacctgcgt ctcattggcaa
gggtgcccac aggcaggaca tccttggtcaa
aagacatgct gcaggtctgg aacagagtct
agactcccgt cacaagctgg acagacgttc
gtggcagcct catcggaacg cgttccagag
taaaccaggt tagagctgtc attgggaaag
ggagatacga agacgtcttg atccaggaag
aatgtaaata atgtgaatga gaaaatgcat
accggatact gggtagacgg tgctgcctgc
atctgacaac agaaagttag aaagccctca
tggaagttag aagaccaacg tcaggccacg

9420 tcatgagacc tgcagcagaa ggaaagaccg
9480 gggggagtgg acaggtggtc acttatgctc
9540 tcgttaggct gatggaggct gaggggggtca
9600 ggaaaaacaa gatagctgtc aggacttggc
9660 ggatggcgat cagcggagac gactgtgtcg
9720 ccctccattt cctcaacgca atgtcaaagg
9780 cgcacggctg gcacgattgg cagcaagttc
9840 tgatgaaaga cggaaggagt atagtgtcc
9900 gggctcgcat ctctccagga gctggatgga
9960 catatgcaca gatgtggcta ctctataact
10020 atgcgatttg ctcagcagtg ccagtggatt
10080 tacactcgaa aggagagtgg atgaccacgg
10140 ggattgaaga aaatgaatgg atgatggata
10200 cgtatgtggg aaagcgtgag gacatctggt
10260 caacctgggc tgagaacatc tatgcggcga
10320 aaaattatgt tgactacatg acctcactca
10380 acagggtcat ctagtgtgac ttaaggtaga
10440 gtatatggag tcaggccagc aaaagctgcc
10500 gtctcagtcc caggaggact gggttaacaa
10560 gaaccgtctc ggaagttagt ccctgctcac
10620 aatttgtgcc actccgtgg ggagtgcggc

ctgcgagcc ccaggaggac tgggttacca
cgtctaggat gcaatagacg aggtgtaagg
aacaacatgc ggccaagcc ccctcgaagc
aggagacccc gcatttgcac caaacagcat
tctgctctat ctcaacatca gctactaggc
aggaagaaca caggatctcg agcggccgcg
agagggattt gttccctagg cctaattatt
ccttttctaa ttctcgtata ctatagttag
caattctcat gtttgacagc ttatcatcga
tattcaggcg tagcaaccag gcgtttaagg
cccgccctgc cactcatcgc agtactgttg
gccatcacia acggcatgat gaacctgaat
cgtataatat ttgcccatgg tgaaaacggg
taaatcaaaa ctggtgaaac tcaccaggg
aaacccttta gggaaatagg ccagggtttc
gtgtagaaac tgccggaaat cgtcgtggta
ttgctcatgg aaaacgggtg aacaagggtg
tttcattgcc atacggaatt ccggatgagc
ggccggataa aacttgtgct tatttttctt
ctgaacggtc tggttatagg tacattgagc
acgatgccat tgggatatat caacgggtgg

10680 aagccgttga ggccccacg gcccaagcct
10740 actagagggt agaggagacc ccgtggaaac
10800 tgtagaggag gtggaaggac tagaggttag
10860 attgacacct gggaatagac tgggagatct
10920 acagagcgcc gaagtatgta gctggtggtg
10980 gaccgactag cctcttttcg gccttcgctg
11040 atttttaatt gcccaatacg tatacagagt
11100 tcgtattatc tagccgcccc ggccgtcgac
11160 atttctgcca ttcatccgct tattatcact
11220 gcaccaataa ctgccttaaa aaaattacgc
11280 taattcatta agcattctgc cgacatggaa
11340 cgccagcggc atcagcacct tgtcgccttg
11400 ggcaagaag ttgtccatat tggccacgtt
11460 attggctgag acgaaaaaca tattctcaat
11520 accgtaacac gccacatctt gcgaatatat
11580 ttactccag agcgatgaaa acgtttcagt
11640 aacactatcc catatcacca gctcaccgtc
11700 attcatcagg cgggcaagaa tgtgaataaa
11760 tacggtcttt aaaaaggccg taatatccag
11820 aactgactga aatgcctcaa aatgttcttt
11880 atatccagtg atttttttct ccatttttagc

ttccttagct cctgaaaatc tcgataactc
attatggtga aagttggaac ctcttacgtg
ggcccagggc ttcccgggtat caacagggac
ttccgtcaca ggtatttatt cgcgataagc
ggacagagaa agcgcggatc tgggaagtga
aggcggttgc cgccgctgct gctgacggtg
cgttccgcca ttcctatgcg atgcacatgc
aaagcctgat gggacataag tccatcagtt
tggatgtggc tgcccggcac cgggtgcagt
tgctgaaaca attatcctga gaataaatgc
gtggatatgc tgtttttgtc tgttaaacag
acgaaacagt cgggaaaatc tcccattatc
ctgtgtagcg tttataggaa gtagtgttct
gatitgaata tgccttcagg aacaatagaa
cggattatgt cagcaatgga cagaacaacc
ccttttacag ccagtagtgc tcgccgcagt
gaggaagcac cagggaacag cacttatata
tcccttgggg ttatccactt atccacgggg
ttagatcttc ttttttagag cgcctttag
gttgtgacaa attgcccttt cagtgtgaca
acaaattgcc cttaaccctg tgacaaattg

11940 aaaaaatagc cccggtagtg atcttatttc
12000 ccgatcaacg tctcattttc gccaaaagtt
12060 accaggattt atttattctg cgaagtgatc
12120 tcatggagcg gcgtaaccgt cgcacaggaa
12180 cggacagAAC ggtcaggacc tggattgggg
12240 tgacgttttc tgttccggtc acaccacata
12300 tgtatgccgg tataccgctg aaagtctgc
12360 caacggaagt ctacacgaag gtttttgcgc
12420 ttgcgatgcc ggagtctgat gcggttgca
12480 cttggccttt atatggaaat gtggaactga
12540 agaagctggc tgttatccac tgagaagcga
12600 gtagagatcc gcattattaa tctcaggagc
12660 gtcattgatc ctgcaagcgg taacgaaaac
12720 atcttcgtgc ggtgttacgt tgaagtggag
12780 taatgaacac agaaccatga tgtggtctgt
12840 cgagcgacag ggcgaagccc tcgagtgagc
12900 ttctgcttac acacgatgcc tgaaaaaact
12960 atatttttat aattattttt tttatagttt
13020 gcctttatcc atgctggttc tagagaaggt
13080 aatcacctc aaatgacagt cctgtctgtg
13140 ccctcagaag aagctgtttt ttcacaaagt

tatccctgct tattgactct tttttattta
 acatggatct gtcattggcg aaacagcggt
 gcgaatcgtc cagtcaaacg acctcactga
 acgtatgctg tatctgttcg ttgaccagat
 tgacggatc tgcgagatcc atgttgctaa
 ggaagccagt aaggatatac ggcaggcatt
 ttatcgccct gaagaggatg ccggcgatga
 caaacgtgcg cacagtccat ccagagggt
 tcccttcttt atcgggttac agaaccggtt
 aatcaccaat ccgtatgcca tgcgtttata
 tggctcaggc atcgtctctc tgaaaatcga
 aagttaccag cgtatgcctg acttccgccg
 caacagcaga actccaatgc gcctctcata
 tcatatcgta ttttccttcc gcgatatac
 tctgtcacag atttgagggt gggttcgtac
 cacagttttg ctgtttcctt cagcctgcat
 ttttaaggaag ccaaatttga gggcagtttg
 tcatgtgacc tgatatcggg ggtagttcg
 ttattactct gaattggcta tccgcgtgtg
 atatttcttc ttgcgtgag cgtaagagct
 cgccagttcg ctgctatgc tcggttacac

13200 gtgtgacaat ctaaaaactt gtcacacttc
 13260 tatcaatcac aagaaacgta aaaatagccc
 13320 ggcgcatat agtctctccc gggatcaaaa
 13380 cagaaaatct gatggcacc tacaggaaca
 13440 atatgctgaa atattcggat tgacctctgc
 13500 gaagagtttc gcggggaagg aagtggtttt
 13560 aaaaggctat gaatcttttc cttggtttat
 13620 ttacagtgt catatcaacc catatctcat
 13680 tacgcagttt cggcttagtg aaacaaaaga
 13740 cgaatccctg tgtcagtatc gtaagccgga
 13800 ctggatcata gagcgttacc agctgcctca
 13860 ccgttcctg caggctctgtg ttaatgagat
 13920 cattgagaaa aagaaaggcc gccagacgac
 13980 ttccatgacg acaggatagt ctgagggtta
 14040 atttgttctg acctactgag ggtaatttgt
 14100 ggattttctc atactttttg aactgtaatt
 14160 tcacagtiga tttccttctc tttcccttcg
 14220 tcatcattga tgagggttga ttatcacagt
 14280 tacctctacc tggagttttt cccacgggtg
 14340 atctgacaga acagttcttc tttgcttcct
 14400 ggctgcggcg agcgttagtg ataataagt

actgaggtat gtgctcttct tatctccttt
gcggtttttt gatgactttg cgattttgtt
aaaaaacgc aaagcaatga ttaaaggatg
cagtgcataa acgctggtca tgaaatgacg
gacagcccgg aagcgaggaa aataaccggg
gttgggggtt cttctcaggc tatcagagat
gatatggaaa ttcgaggacg ggttgagcaa
catatgcgtg atgtgtttgg tacgcgattg
atcgggggtt ctgcccataa aggtggcggt
caggatctgg ctctgaaggg gctacgtgtt
acagcctcaa tgtatcacgg atgggtacca
ctgcctttct atcttgggga aaaggacgat
ccggggcctt acattattcc ttcctgtctg
ggcaaatttg atgaaggtaa actgcccacc
gaaactgttg ctcatgacta tgatgtcata
ggcacgatta atgtcgtatg tgctgctgat
tttgactaca cctccgcact gcagtttttc
gatcttaaag ggttcgagcc tgatgtacgt
ggctctcagt ccccgtagat ggaggagcaa
aaaaatgttg tacgtgaaac ggatgaagtt
tttgaacagg ccattgatca acgctcttca

14460 tgtagtgttg ctcttatitt aaacaacttt
14520 gttgctttgc agtaaattgc aagatttaat
14580 ttcagaatga aactcatgga aacacttaac
14640 aaggctatcg ccattgcaca gttaaatgat
14700 cgctggagaa taggtgaagc agcggattta
14760 gccgagaaag cagggcgact accgcacccg
14820 cgtgttggtt atacaattga acaaattaat
14880 cgacgtgctg aagacgtatt tccaccggtg
14940 tacaaaacct cagtttctgt tcatcttgct
15000 ttgctcgtgg aaggtaacga ccccaggga
15060 gatcttcata ttcatgcaga agacactctc
15120 gtcacttatg caataaagcc cacttgctgg
15180 gctctgcacc gtattgaaac tgagttaatg
15240 gatccacacc tgatgctccg actggccatt
15300 gttattgaca gcgcgcctaa cctgggtatc
15360 gtgctgattg ttcccacgcc tgctgagttg
15420 gatatgcttc gtgatctgct caagaacgtt
15480 attttgctta ccaaatacag caatagtaat
15540 attcgggatg cctggggaag catggttcta
15600 ggtaaaggtc agatccggat gagaactgtt
15660 actgggtgcct ggagaaatgc tctttctatt

tgggaacctg tctgcaatga aattttcgat
taatgaagcg tgcgcctggt attccaaaac
cttcgttatc gacaccagct gccccgatgg
tggctcgcgg taatgccatt actttgcctg
aagtgctccg gggatgatagt gttgagaaga
accaggagct gcttactgag gacgcactgg
gtcaacagac accggcggtc ggtcgaagag
gtcgccgtcg taaagctgct gcacttaccg
tggatgatga gcagatggct gcattatcca
cttatgaacg tggtcagcgt tatgcaagcc
ctgcgctggc tgatgcggaa aatatttcac
ccaaatigcc taaatcagtt gttgctcttt
caggtgatgc acttcaaaaa gcctttacag
ctaaccttca tgagcagaaa aaagctgggg
ttttaacttc tgtgcttaaa acgtcatctg
agtttgctcc tggagcgaca gtattgtata
ggctctgtgt tccaactgag tgtatagaga
agccagcacc ctgatgcgac cacgttttag
tttgttacag gccagaaaagc ataactggcc
ttgtatcgtc ggtctgataa tcagactggg
ttattagtct gggaccacgg tcccactcgt

15720 cgtctgatta aaccacgctg ggagattaga
15780 atacgtcaa tactcaaccg gttgaagata
15840 tggattcggt aattgcgcgc gtaggagtaa
15900 tatgtggctg ggaatgaag tttactcttg
15960 cctctcgggt atggtcaggt aatgaacgtg
16020 atgatctcat ccttctttt ctactgactg
16080 tatctgggtg catagaaatt gccgatggga
16140 aaagtgatta tcgtgttctg gttggcgagc
16200 gattgggtaa cgattatcg ccaacaagtg
16260 gattgcagaa tgaatttgct ggaaatattt
16320 gtaagattat taccgctgt atcaacaccg
16380 tttctcacc cggatgaacta tctgcccgg
16440 ataaagagga attacttaag cagcaggcat
16500 tgatatttga agctgaagaa gttatcactc
16560 catcaagaac tagtttaagc tcacgacatc
16620 agggcgataa aatgggtgctt aacctggaca
16680 aaattgaggc cattcttaag gaacttgaaa
16740 tctacgttta tctgtcttta cttaatgtcc
16800 tgaatattct ctctggggccc actgttccac
16860 accacgggtc cactcgtatc gtcgggtctga
16920 atcgtcggtc tgattattag tctgggacca

cggccccact cgtatcgctg gtctgataat
 tcggtctgat tattagtctg ggaccatggt
 ctgggaccac ggtccactc gtatcgtcgg
 ctcgatcgt cggtctgatt attagtctgg
 attattagtc tgggaccacg atccactcg
 acggccccac ttgtattgtc gatcagacta
 tgtcaagggc aagtattgac atgtcgctgt
 ggttgatgc ctgctgtgga ttgctgctgt
 gttatgtgga caaaatacct ggttaccag
 cgatgcaagt gtgtcgctgt cgacgagctc
 cagtgtcgct gatttgtatt gtctgaagtt
 aatacgatac ctgcgtcata attgattatt
 gtgatatgta gatgataatc attatcactt
 acggggcggc gacctcgcg gtttcgcta
 ccgttcttct tcgtcataac ttaatgtttt
 acgacagggtg ctgaaagcga gctttttggc
 gtggaatgaa caatggaagt ccgagctcat
 cgaagttata ttcgatgcgg cgctgaggtc
 accaggcctg aatcgcccca tcatccagcc
 ctttgttgta ggtggaccag ttggtgattt
 cgttgtcggg aagatgcgtg atctgacct

16980 cagactggga ccacggcccc actcgatcgc
 17040 cccactcgta tcgtcggctt gattattagt
 17100 tctgattatt agtctggaac cacggcccc
 17160 gaccacggtc ccactcgat cgctcggctg
 17220 tgttgctggt ctgattatcg gtctgggacc
 17280 tcagcgtgag actacgattc catcaatgcc
 17340 aacctgtaga acggagtaac ctcggtgtgc
 17400 gtcctgctta tccacaacat tttgcgcacg
 17460 gccgtgccgg cacgttaacc gggctgcatc
 17520 gcgagctcgg acatgagggt gccccgtatt
 17580 gtttttacgt taagttgatg cagatcaatt
 17640 tgacgtggtt tgatggcctc cacgcacgtt
 17700 tacgggtcct ttccggtgat ccgacaggtt
 17760 tttatgaaaa tttccggtt taaggcggtt
 17820 tatttaaaat accctctgaa aagaaaggaa
 17880 ctctgtcgtt tcctttctct gttttgtcc
 17940 cgctaataac ttcgtatagc atacattata
 18000 tgcctcgtga agaagggtgt gctgactcat
 18060 agaaagttag ggagccacgg ttgatgagag
 18120 tgaacttttg ctttgccacg gaacggctg
 18180 tcaactcagc aaaagttcga tttattcaac

aaagccacgt gtctcaaaat ctctgatgtt	18240 acattgcaca agataaaaat atatcatcat
gaacaataaa actgtctgct tacataaaca	18300 gtaatacaag ggggtgttatg agccatattc
aacgggaaac gtcttgctcg acgatgataa	18360 gctgtcaaac atgagaattg ggtcgtcaat
atgctaaaac gcggcataacc ccgcgtattc	18420 ccactagtta atcgtacgaa ttccgtatgg
caatgaaaga cggtagctg gtgatatggg	18480 atagtgttca cccttgttac accgttttcc
atgagcaaac tgaaacgttt tcatcgctct	18540 ggagtgaata ccacgacgat ttccggcagt
ttctacacat atattcgcaa gatgtggcgt	18600 gttacggatga aaacctggcc tatttccta
aagggtttat tgagaatatg tttttcgtct	18660 cagccaatcc ctgggtgagt ttcaccagtt
ttgatttaaa cgtggccaat atggacaact	18720 tcttcgcccc cgttttcacc atgggcaa
attatacgca aggcgacaag gtgctgatgc	18780 cgctggcgat tcaggttcat catgccgttt
gtgatggctt ccatgtcggc agaatgctta	18840 atgaattaca acagtactgc gatgagtggc
agggcggggc gtaatTTTTT taaggcagtt	18900 attggtgccc ttaaagcct ggttgctacg
cctgaataag tgataataag cggatgaatg	18960 gcagaaattc gatgataagc tgtcaa
gagaattggt cgacggcccg ggcggctaga	19020 taatacgact cactatag

19038 <210> 48 <211> 19040 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> sequence for pBACT7/JVFLx/XbaI <400> 48 agaagtttat ctgtgtgaac ttcttggtt agtatcgttg agaagaatcg agagattagt 60 gcagttaaa cagtttttta gaacggaaga

120 gtaaaaaccg ggctatcaat atgctgaaac

180 gtagtaagag ggtagtaatg agcttggttg

240 ctcttatcac gttcttcaag tttacagcat

300 ggaaagcagt ggaaaagagt gtggcaatga

aacatcttac tagtttcaaa cgagaacttg
gcagaaagca aaacaaaaga ggaggaaatg
cagttgtcat agcttgtgta ggagccatga
tgaccattaa caacacggac attgcagacg
acagatgctg ggtccgggca atcgatgtcg
aatgtcctaa gcttaccatg ggcaatgatc
aagaagtcta cgtccaatat ggacgggtgca
ggtccgtgtc ggtccaaaca catggggaga
tggattcaac gaaagccaca cgatatctca
ctggctatgc tttcctggcg gcggtacttg
gcgtgggtgtt taccatcctc ctgctgttgg
gaatgggcaa ccgtgacttc atagaaggag
tagaaggaga tagctgcttg acaatcatgg
tgattaacat cgaagccagc caacttgctg
tactgacat ctcgacgggtg gctcggtgcc
gagctgatag tagctatgtg tgcaaacaag
gtggactttt cgggaaggga agcattgaca
cgattgggag aacaatccag ccagaaaaca
gaaccaccac ctcggaaaac catgggaatt
caaagtttac agtaacaccc aatgctcctt
aagtcacact ggactgtgaa ccaaggagtg

360 gaacactcat tgacgccgtg aacaagcggg
420 aaggctcaat catgtggctc gcgagtttgg
480 agttgtcaaa tttccaaggg aagcttttga
540 tcatcgtgat tcctacctca aaaggagaga
600 gctacatgtg tgaggacact atcacgtacg
660 cagaggatgt ggattgctgg tgtgacaacc
720 cgcggaccag gcattccaag cgaagcagga
780 gttcactagt gaataaaaaa gaggcttggc
840 tgaaaactga gaactggatc ataaggaatc
900 gctggatgct tggcagtaac aatggtcaac
960 tcgctccggc ttacagtttt aattgtctgg
1020 ccagtggagc cacttgggtg gacttagtgc
1080 caaacgacaa accaacattg gacgtccgca
1140 aggtcagaag ctactgctat catgcttcag
1200 ccacgactgg agaagcccac aacgagaagc
1260 gtttactga tcgtgggtgg ggcaacggat
1320 catgtgcaaa attctcctgc accagtaagg
1380 tcaaatacga agttggcatt tttgtgcatg
1440 attcagcgca agtaggggcg tcccaggcgg
1500 cgataaccct caaacttggg gactacggag
1560 gactgaacac tgaagcgttt tacgtcatga

ccgtggggtc aaagtcattt ctgggccata
ggacgtcccc ttcgagcaca gcgtggagaa
cgcacgccac aaaacagtcc gttgttgctc
cgctggcagg agccatcgtg gtggagtact
tgaaatgtag gctgaaaatg gacaaactgg
cagaaaaatt ctcgttcgcg aaaaatccgg
aactctccta ttctgggagt gatggcccct
tcaatgacat gacccccgtt gggcggctgg
gtgccaactc aaaggtgctg gtcgagatgg
ttggaagggg agacaagcag atcaaccacc
aggctttttc aacaactttg aaggagctc
gggactttgg ctctattgga ggggtcttca
ttggtggcgc ttccagaaca ctctttgggg
gtgccctact actctggatg ggcatcaacg
tgccacagg aggtgtgctc gtgttcttag
ccattgacat cgcaagaaaa gagatgagat
tggaagcctg ggtggatagg tataaatatt
tcgtccaaa agcgcacaag gaaggcgtgt
accaaagtgt ggaagccgtg cgggacgaat
acctcagtgt gttgtgaac aagcccgtgg
ccatgacgca agagaagttt gaaatgggct

1620 gggaatggtt tcatgacctc gctctcccct
1680 acagagaact cctcatggaa ttggaagagg
1740 ttgggtcaca ggaaggaggc ctccatcagg
1800 caagctcagt gaagttaaca tcaggccacc
1860 ctctgaaagg cacaacctat ggcatgtgta
1920 cggacactgg ccacggaaca gttgtcattg
1980 gcaaaattcc gattgtctcc gttgcgagcc
2040 tgacagtga ccccttcgtc gcgacttcca
2100 aacccccctt cggagactcc tacatcgtag
2160 attggcataa agctggaagc acgctgggca
2220 aaagactggc agcgttgggc gacacagcct
2280 actccatagg aaaggccgtt caccaagtgt
2340 gaatgtcttg gatcacacaa gggttaatgg
2400 cacgagatcg atcaattgct ttggccttct
2460 cgaccaatgt gcatgctgac actggatgtg
2520 gcggaagtgg catcttcgtg cacaacgacg
2580 tgccagaaac gccagatcc ctagcgaaga
2640 gcggagtcag atctgtcact agactggagc
2700 tgaacgtcct gctcaaagag aatgcagtgg
2760 ggagatatcg ctacagcccca aaacgcctgt
2820 ggaaagcatg gggaaaaagc attctctttg

ccccggaatt ggctaactcc acatttgttg
atgagcacag agcctggaac agcatgcaaa
cccgtgtgtg gctgaagatt agagaggaaa
gcacagctgt caaaggacat gtggcagttc
gctacaacga cacatggaaa cttgagaggg
ggccagagac acacactctt tggggagatg
ataccatagc cggacaaaa agcaagcaca
agggaccttg ggacgaaaac ggcatagtct
tcaccatcac agaggattgt ggcaagagag
gaaagttgat tactgactgg tgctgtcgca
cagaaaatgg ctgctggtac ggaatggaaa
tcgtcagatc acaggttgat gctttcaatg
ttctggtgat gtttctggcc acccaggagg
ccattcctgc ggttttgggg gccctgcttg
atttggcgag gtatgtggtg ctagtcgctg
acgtcctgca ccttgctttg attgccgttt
acatgcttag cacgagatgg acgaaccaag
tctttcaatt ggcctcagta gatctgcaaa
ctatagcatg gatgattggt cgagcgatca
cagtcttagc gcttctaact ccgggaatga
tccttctcgt catagggatt tgctccctgc

2880 tagatggacc tgagacaaag gaatgtcctg
2940 tcgaagactt cggcttttgt atcacatcaa
3000 gcaçtgacga gtgtgatgga gcgatcatag
3060 atagtactt gtcgtactgg attgagagtc
3120 cagtctttgg agaggtaaaa tcttgactt
3180 gtgttgagga aagtgaactc atcatccgc
3240 atcggaggga aggtacaaa acacaaaacc
3300 tggactttga ttattgccca gggacaaaag
3360 gcccttcggt cagaaccact actgacagtg
3420 gttgctccct tccgccccta cgattccgga
3480 tcagacctgt taggcatgat gaaacaacac
3540 gtgaaatggt tgaccctttt cagctgggcc
3600 tccttcgcaa gaggtggacg gccagattga
3660 tgctgatgct tgggggcatc acttacactg
3720 ctgctttcgc agaggccaat aatggaggag
3780 ttaagatcca accagctttt ctagtgatga
3840 aaaacgtggt cctggctcta ggggctgcct
3900 tcggagtcca cggaatcctg aatgccgccg
3960 ccttccccac aacctcctcc gtcaccatgc
4020 gggctctata cctagacact tacagaatca
4080 tgcaagagag gaaaaagacc atggcaaaaa

agaaaggagc tgtactcttg ggcttagcgc
ccatagctgc tggactaatg gtctgcaacc
agtttctgtc ggcagtcgga ttgatgtttg
ttgaatccat gtcaataccc ttcattgctgg
caggaaaagc aacagatatg tggctcgaac
ctgcaatcac aggaagcagt cggaggctgg
acttgattga tgatcccggc gttccatgga
gcttagccgc cctcacgcct tgggccattg
taaaaacaac aaaaagaggg ggcgtgtttt
aaggagacac cactacagga gtctaccgaa
aggctggcgt cggagtcattg tacgagaatg
gggcagccat tatgagtggga gaaggaaaat
accgcatagc ttacggaggc ccatggagat
tgcaagtgat cgtggtagaa ccggggaagg
tgtttcggac ccccttcggg gaggttgggg
ccggctcacc cattctggat tccaatggag
agcttggcga tggctcatac gtcagcgcca
tcccagaagc ttacactcca aacatgttaa
accctggttc agggaaaacc aggaaaatic
agcgcctaag aacagctgtg ttggcaccga
ctttgagagg gctcccagta cgataccaaa

4140 tcacatccac tggatggttc tcgcccacca
4200 caaacaagaa gagagggtgg ccagctactg
4260 ccatcgtagg tggtttggcc gagttggata
4320 caggtcttat ggcagtgtcc tacgtagtgt
4380 gggccgccga catcagctgg gagatggatg
4440 atgtgaaact ggatgatgac ggagattttc
4500 aagtttgggt cttgcgcatg tcttgcattg
4560 ttcccgccgc ttccggttac tggctcactt
4620 gggacacgcc atccccgaaa ccttgcttaa
4680 tcatggctag agggattctt ggcacctacc
4740 ttttccacac actatggcac acaactagag
4800 tgacgccata ctggggtagc gtgaaagaag
4860 ttgatcgaaa atggaatgga acagatgacg
4920 ctgcggtaaa catccagaca aaaccaggag
4980 ctgttagcct ggattacccg cgaggaacat
5040 acatcatagg cctatacggc aatggagittg
5100 tcgtgcaggg tgaccgtcag gaggaaccag
5160 gaaagagaca gatgactgtg ttagatttgc
5220 tgccacaaat aattaaggat gcaatccagc
5280 cgcgggtggt agcagcagaa atggcagaag
5340 cttcagcagt gcagagagag caccaaggga

atgaaatagt ggatgtgatg tgccacgcca
 gagtgcccaa ctacaatctg tttgtcatgg
 tagccgcacg aggatacatc gctaccaagg
 tgacagcgac cccgcctgga accacggatc
 atttacaaga tgagatacca gacagggcat
 atgcgggtaa aaccgtgtgg tttgtggcga
 gcctccaaag agcgggaaaa aaggtcatcc
 acccaaatg taagaatgga gactgggatt
 gggctaactt cgggtgcgagc agggcatcg
 tagaagaggg agaaggcaga gtcattcctg
 cagctcaacg gaggggcaga gtaggcagaa
 atggaggggc taccagtga gatgacagta
 tgttagacaa catacacatg cccaatgggc
 aaaaggcttt cacaatggat ggcgaatacc
 tagagctgct taggacggct gaccttccgg
 gcattcagta caccgacaga aagtgggtgtt
 aggacaacac cgaggtagag atagtcaccc
 gatggcttga tgcaagagta tacgcagatc
 cagcaggaaa gagatcggcc gttagcttca
 tcatgggaaa gacgcgggaa gctttagaca
 gtgggaaggc acaccgaatg gctctcgaag

5400 ctctgacca cagattgatg tcaccgaaca
 5460 atgaagctca tttcaccgac ccagccagca
 5520 tggaattagg agaggcagca gccatcttta
 5580 cttttccga ctcaaatgcc ccaatccatg
 5640 ggagcagtgg atacgaatgg atcacagaat
 5700 gcgtaaaaat ggggaatgag attgcaatgt
 5760 aactcaaccg caagtcctat gacacagaat
 5820 ttgtcattac caccgacatc tctgaaatgg
 5880 actgcagaaa gagcgtgaaa cccaccatct
 5940 gaaacccatc tcccataacc agtgctagcg
 6000 accccaacca agttggagat gaataccatt
 6060 acctagccca ttggacagag gcaaagatca
 6120 tgggtggccca gctctatgga ccagagaggg
 6180 gtctcagggg tgaagaaaag aaaaacttct
 6240 tgtggctggc ctataaggtg gcgtccaatg
 6300 ttgatgggcc gcgcacgaat gccatactgg
 6360 ggatgggtga gagaaagatc ctcaagccga
 6420 accaagccct caagtgggtc aaagactttg
 6480 tagaggtgct cggtcgcatg cctgagcatt
 6540 ccatgtactt ggtcgcaacg gctgagaaag
 6600 agttgccgga tgcactggaa accatcacac

ttattgttgc catcactgta atgacaggag
 gtatagggaa gatgggtctt ggagctctag
 cggcagaggt tcctggaacc aaaatagcag
 tggttctcat ccagaaccg gaaaaacaga
 ttctcatctg cgtcttgacc gtggttggag
 aaaaaaccaa agcagatctc aagagcatgt
 ctggattgcc aagcatggca ctggacctgc
 ggagcacagt tgtgctaacc cctcttctga
 catcgctagc ctcaattaac tcacaagctg
 ctttcaccga tctagacctg accgttggcc
 ccctcacaac gtttttgaca gccatggttc
 ctggatggca agcagaagca ctcagggctg
 agaatgccgt tgttgacgga atggtcgcca
 ctctgatgca aaagaaagtc ggacaggtgc
 tcgtcaacc taatgtcacc actgtgagag
 tcaccttgtg ggataatgga gccagtgccg
 gccatgtcat gcgaggtagc tacctggctg
 acgtgacaa gccctccttg aaaaggggaa
 ggaaggaaaa actaaatgcc atgagcagag
 taatcgaggt ggaccgcact gaagcacgca
 gacatccggt ttcgcgaggc tcagcaaac

6660 gattcttcct actaatgatg cagcgaaagg
 6720 tgctcacgct agctaccttc ttcctgtggg
 6780 ggacctgct gatcgccctg ctgctgatgg
 6840 ggtcacagac agacaaccaa ctagcgggtg
 6900 tggtagcagc aaacgagtag gggatgctag
 6960 ttggcggaaa gacacaggca tcaggactga
 7020 gtccagccac agcctgggca ctgtatgggg
 7080 agcacctgat cacgtcgga tatgtcacca
 7140 gtcattatt cgtcttgcca cgaggcgtgc
 7200 tcgtcttcct tggctgctgg ggtcaaatca
 7260 tggcgacact tcactatggg tacatgctcc
 7320 ccagagaag gacggcggct ggaataatga
 7380 ctgatgtgcc tgaactggaa aggactactc
 7440 tcctcatagg ggtgagcgtg gcagcgttcc
 7500 aagcaggggt gttggtgacg gcggctacgc
 7560 tttggaattc caccacagcc acgggactct
 7620 gaggtcttat tgcttgact ctatcaaga
 7680 ggcctggggg caggacgcta ggggagcagt
 7740 aagagttttt taaataccgg agagaggcca
 7800 gggctagacg tgaaaataac atagtgggag
 7860 tccgttggct cgtggagaaa ggattcgtct

cgccaatagg aaaagtcatt gatctagggt
 caaccctgaa gaaggtccag gaagtcagag
 agccgatgct catgcagagc tacggctgga
 tgtttctaaa accttcagag cctagtaca
 caagtcaga agtgaagaa caacgcacac
 tgcacgagg acccagagag ttctgcataa
 tagaaaaaat ggaagttctg cagcgccgct
 cccgaaactc caatcacgag atgtattggg
 ctgtgaacat gaccagccag gtactactgg
 caaagtatga ggaagatgtc aacctaggta
 ttcatagcaa tcaggagaaa atcaagaaga
 caacgtggca caaagaccct gaacacccat
 aggtgaaggc tactggctca gccagctctc
 aaccttggga cgccattgcc aacgtcacca
 gacagcaaag agttttcaag gagaaagttg
 tcaaggaagt gctcaacgag accaccaact
 gaccccgctt gtgcaccaag gaagaattta
 gagcagtgtt tgctgaacag aatcaatgga
 ggttttggga gatgggtcaat gaagagaggg
 gtatctaaa catgatggga aaaagagaga
 ggagcagggc catttggttc atgtggcttg

7920 gtgggcgtgg aggatggagc tactacgcag
 7980 gatacacgaa aggtggggcg ggacatgaag
 8040 acctggtctc ctigaagagt ggagtggatg
 8100 ccctgttctg tgacataggg gaatcctccc
 8160 tacgcgtcct agagatgaca tccgattggg
 8220 aagttctctg cccttacatg cccaaggtca
 8280 tcggaggtgg gctagtacgt ctccccctgt
 8340 ttagtggagc cgctggcaat gtggtgcacg
 8400 ggcgaatgga tcgcacagtg tggagagggc
 8460 gcggaacaag agccgtggga aaggagagaag
 8520 gaatccagaa gcttaaagaa gaattcgcca
 8580 accgcacttg gacataccac ggaagctatg
 8640 tcgtcaacgg agtgggtgaag ctcatgagta
 8700 ccatggccat gactgacacc accccttttg
 8760 acacgaaagc tcctgagcca ccagctggag
 8820 ggctgtgggc ccacttgtca cgggaaaaaa
 8880 taaagaaagt caatagcaac gcggctcttg
 8940 gcacggcgcg tgaggctgtg gacgacccgc
 9000 aaaaccatct gcgaggagag tgtcacacat
 9060 agaagcctgg agagtttggga aaagctaaag
 9120 gagcacggta tcttgagttt gaagcttttg

ggttcctgaa tgaagaccac tggctgagcc
 caggcgtcca aaagttggga tacatcctcc
 tgtacgctga tgacaccgcc gggtgggaca
 aagctaaggt gctggagctc ctagatgggtg
 aactgactta caggcacaaa gtggtcaagg
 tgatggacgt gatatcaaga gaagaccaaa
 tcaacacttt cacgaacatc gctgtccagc
 ttgggccaca acacttggaa cagctgccta
 tctttgagaa tggagaggag agagtgacca
 tcaagccgct ggacgacaga ttgccacgg
 ttagaaaaga catccaggaa tggaaagcctt
 ctttctgctc taaccacttt caggagattg
 cgtgcagagg acaggatgag ctgataggca
 atgtgaagga cacagcttgc ctggcaaaag
 tccatcgtag ggacctgcgt ctcatggcaa
 gggtgcccac aggcaggaca tcctggtcaa
 aagacatgct gcaggtctgg aacagagtct
 agactcccgt cacaagctgg acagacgttc
 gtggcagcct catcggaacg cgttccagag
 taaaccaggt tagagctgtc attgggaaag
 ggagatacga agacgtcttg atccaggaag

9180 gagagaattc aggaggtgga gtagaaggct
 9240 gtgacatagc aggaaagcaa ggagggaaaa
 9300 ctagaattac tagaactgat ttagaaaatg
 9360 aacaccgcat gctcgcccgg gccataattg
 9420 tcatgagacc tgcagcagaa ggaaagaccg
 9480 gggggagtgg acaggtggtc acttatgctc
 9540 tcgttaggct gatggaggct gagggggtca
 9600 ggaaaaacaa gatagctgtc aggacttggc
 9660 ggatggcgat cagcggagac gactgtgtcg
 9720 ccctccattt cctcaacgca atgtcaaagg
 9780 cgcacggctg gcacgattgg cagcaagttc
 9840 tgatgaaaga cggaaggagt atagtgtcc
 9900 gggctcgcat ctctccagga gctggatgga
 9960 catatgcaca gatgtggcta ctctatact
 10020 atgcgatttg ctacgagtg ccagtggatt
 10080 tacactcgaa aggagagtgg atgaccacgg
 10140 ggattgaaga aatgaatgg atgatggata
 10200 cgtatgtggg aaagcgtgag gacatctggt
 10260 caacctgggc tgagaacatc tatgcggcga
 10320 aaaattatgt tgactacatg acctcactca
 10380 acagggtcat ctagtgtgac ttaaggtaga

aatgtaaata atgtgaatga gaaaatgcat
 accggatact gggtagacgg tgctgcctgc
 atctgacaac agaaagttag aaagccctca
 tggaagttag aagaccaacg tcaggccacg
 ctgcgagcc ccaggaggac tgggttacca
 cgtctaggat gcaatagacg aggtgtaagg
 aacaacatgc ggccaagcc ccctcgaagc
 aggagacccc gcatttgcac caaacagcat
 tctgctctat ctcaacatca gctactaggc
 aggaagaaca caggatctct agagcggccg
 tgagagggat ttgttccta ggcctaatta
 tgccttttct aattctcgta tactatagtg
 accaattctc atgtttgaca gcttatcatc
 cttattcagg cgtagcaacc aggcgtttta
 gccccgccct gccactcatc gcagtactgt
 aagccatcac aaacggcatg atgaacctga
 tgcgtataat atttgcccat ggtgaaaacg
 tttaaataca aactggtgaa actcaccag
 ataaaccctt tagggaaata ggccaggttt
 atgtgtagaa actgccggaa atcgctcgtg
 gtttgctcat ggaaaacggt gtaacaaggg

10440 gtatatggag tcaggccagc aaaagctgcc
 10500 gtctcagtcc caggaggact gggttaacaa
 10560 gaaccgtctc ggaagtaggt cctgctcac
 10620 aatttgtgcc actccgctgg ggagtgcggc
 10680 aagccgttga ggccccacg gcccaagcct
 10740 actagagggt agaggagacc ccgtggaaac
 10800 tgtagaggag gtggaaggac tagaggttag
 10860 attgacacct gggaatagac tgggagatct
 10920 acagagcgcc gaagtatgta gctggtggtg
 10980 cggaccgact agcctctttt cggccttcgc
 11040 ttatttttaa ttgccaata cgtatacgag
 11100 agtcgtatta tctagccgcc cgggccgtcg
 11160 gaatttctgc cattcatccg cttattatca
 11220 gggcaccaat aactgcctta aaaaaattac
 11280 tgtaattcat taagcattct gccgacatgg
 11340 atcgccagcg gcacagcac cttgtgcct
 11400 ggggcgaaga agttgtccat attggccacg
 11460 ggattggctg agacgaaaaa catattctca
 11520 tcaccgtaac acgccacatc ttgcgaatat
 11580 tattcactcc agagcgatga aaacgtttca
 11640 tgaacactat cccatatcac cagctcaccg

tctttcattg ccatacggaa ttccggatga
 aaggccggat aaaacttggtg cttatTTTTc
 agctgaacgg tctggttata ggtacattga
 ttacgatgcc attgggatat atcaacgggtg
 gcttccttag ctctgaaaa tctcgataac
 tcattatggt gaaagttgga acctcttacg
 ttggcccagg gcttcccgggt atcaacaggg
 tcttccgtca caggtattta ttccgataa
 aaggacagag aaagcgcgga tctgggaagt
 ggaggcggtt gccgccgctg ctgctgacgg
 tacgttccgc cattcctatg cgatgcacat
 gcaaagcctg atgggacata agtccatcag
 gctggatgtg gctgcccggc accgggtgca
 gatgctgaaa caattatcct gagaataaat
 gagtggatat gctgtttttg tctgttaaac
 gaacgaaaca gtcgggaaaa tctccatta
 gcctgtgtag cgtttatagg aagtagtggt
 acgatttgaa tatgccttca ggaacaatag
 agcggattat gtcagcaatg gacagaacaa
 gtccttttac agccagtagt gctcgccgca
 gcgaggaagc accaggaac agcacttata

11700 gcattcatca ggcgggcaag aatgtgaata
 11760 ttacgggtct ttaaaaaggc cgtaatatcc
 11820 gcaactgact gaaatgcctc aaaatgttct
 11880 gtatatccag tgattttttt ctccatttta
 11940 tcaaaaaata cgcccggtag tgatcttatt
 12000 tgccgatcaa cgtctcattt tcgccaaaag
 12060 acaccaggat ttatttattc tgcgaagtga
 12120 gctcatggag cggcgtaacc gtcgcacagg
 12180 gacggacaga acggtcagga cctggattgg
 12240 tgtgacgttc tctgttccgg tcacaccaca
 12300 gctgtatgcc ggtataccgc tgaaagttct
 12360 ttcaacggaa gtctacacga aggtttttgc
 12420 gtttgcatg ccggagtctg atgcggttgc
 12480 gccttggcct ttatatggaa atgtggaact
 12540 agagaagctg gctgttatcc actgagaagc
 12600 tcgtagagat ccgcattatt aatctcagga
 12660 ctgtcatgat gcctgcaagc ggtaacgaaa
 12720 aaatcttcgt gcggtgttac gttgaagtgg
 12780 cctaataaac acagaacat gatgtggtct
 12840 gtcgagcgac agggcgaagc cctcgagtga
 12900 tattctgctt acacacgatg cctgaaaaaa

cttcccttgg ggttatccac ttatccacgg
ttttagatct tcttttttag agcgccttgt
gtgttgtgac aaattgccct ttcagtgtga
tgacaaattg cccttaaccc tgtgacaaat
gttatccctg cttattgact cttttttatt
tcacatggat ctgtcatggc ggaaacagcg
ccgcaatcg tccagtcaaa cgacctcact
aaacgtatgc tgtatctgtt cggtgaccag
catgacggta tctgcgagat ccatgttgct
gcggaagcca gtaaggatat acggcaggca
ttttatcgcc ctgaagagga tgccggcgat
atcaaactg cgcacagtcc atccagaggg
attcccttct ttatcgggtt acagaaccgg
gaaatcacca atccgtatgc catgcgttta
gatggctcag gcatcgtctc tctgaaaatc
caaagttacc agcgtatgcc tgacttccgc
atcaacagca gaactccaat gcgcctctca
actcatatcg tattttcctt ccgcgatatc
tatctgtcac agatttgagg gtggttcgtc
gtcacagttt tgctgtttcc ttcagcctgc
tttttaagga agccaaattt gagggcagtt

12960 ggatattttt ataattattt tttttatagt
13020 aggcctttat ccatgctggg tctagagaag
13080 caaatcaccc tcaaatgaca gtcctgtctg
13140 tgccctcaga agaagctgtt ttttcacaaa
13200 tagtgtgaca atctaaaaac ttgtcacact
13260 gttatcaatc acaagaaacg taaaaatagc
13320 gaggcggcat atagtctctc ccgggatcaa
13380 atcagaaaaat ctgatggcac cctacaggaa
13440 aaatatgctg aaatattcgg attgacctct
13500 ttgaagagtt tcgcggggaa ggaagtggtt
13560 gaaaaaggct atgaatcttt tccttggttt
13620 cttacagtg tacatatcaa cccatatctc
13680 ttacgcagt ttcggcttag tgaaacaaaa
13740 tacgaatccc tgtgtcagta tcgtaagccg
13800 gactggatca tagagcggtta ccagctgcct
13860 cgccgcttcc tgcaggtctg tgtaaatgag
13920 tacattgaga aaaagaaagg ccgccagacg
13980 acttccatga cgacaggata gtctgagggt
14040 acatttgttc tgacctactg agggtaatit
14100 atggattttc tcatactttt tgaactgtaa
14160 tgtcacagtt gatttccttc tctttccctt

cgtcatgtga cctgatatcg ggggttagtt
 gtttattact ctgaattggc tatccgcgtg
 ggatatttct tcttgcgctg agcgtaagag
 ctcgccagtt cgctcgctat gctcggttac
 tgactgaggt atgtgctctt cttatctcct
 ttgcggtttt ttgatgactt tgcgattttg
 ataaaaaac gcaaagcaat gattaaagga
 accagtgcac aaacgctggc catgaaatga
 atgacagccc ggaagcgagg aaaataaccc
 tagttggggg tttttctcag gctatcagag
 cggatatgga aattcgagga cgggttgagc
 atcatatgcg tgatgtgttt ggtacgcgat
 tgatcggggg tgctgccccat aaaggtggcg
 ctcaggatct ggctctgaag gggctacgtg
 gaacagcctc aatgtatcac ggatgggtac
 tcctgccttt ctatcttggg gaaaaggacg
 ggccgggggct tgacattatt ctttctgtc
 tgggcaaatt tgatgaaggt aaactgccca
 ttgaaactgt tgctcatgac tatgatgtca
 tcggcacgat taatgtcgta tgtgtgtgctg
 tgtttgacta cacctccgca ctgcagtttt

14220 cgtcatcatt gatgagggtt gattatcaca
 14280 tgtacctcta cctggagttt ttcccacggt
 14340 ctatctgaca gaacagttct tctttgcttc
 14400 acggctgcgg cgagcgctag tgataataag
 14460 tttgtagtgt tgctcttatt ttaaacaact
 14520 ttgttgcttt gcagtaaatt gcaagattta
 14580 tgttcagaat gaaactcatg gaaacactta
 14640 cgaaggctat cgccattgca cagtttaatg
 14700 ggcgctggag aataggtgaa gcagcggatt
 14760 atgccgagaa agcagggcga ctaccgcacc
 14820 aacgtgttgg ttatacaatt gaacaaatta
 14880 tgcgacgtgc tgaagacgta tttccaccgg
 14940 ttacaaaac ctcagtttct gttcatcttg
 15000 ttttgctcgt ggaaggtaac gacccccagg
 15060 cagatcttca tattcatgca gaagacactc
 15120 atgtcactta tgcaataaag cccacttgct
 15180 tggctctgca ccgtattgaa actgagttaa
 15240 ccgatccaca cctgatgctc cgactggcca
 15300 tagttattga cagcgcgcct aacctgggta
 15360 atgtgctgat tgttcccacg cctgctgagt
 15420 tcgatatgct tcgtgatctg ctcaagaacg

ttgatcttaa agggttcgag cctgatgtac
atggctctca gtccccgtgg atggaggagc
taaaaaatgt tgtacgtgaa acggatgaag
tttttgaaca ggccattgat caacgctctt
tttgggaacc tgtctgcaat gaaattttcg
gataatgaag cgtgcgcctg ttattccaaa
tacttcgtta tcgacaccag ctgccccgat
aatggctcgc ggtaatgcca ttactttgcc
tgaagtgctc cggggtgata gtgttgagaa
tgaccaggag ctgcttactg aggacgcact
tggtcaacag acaccggcgt tcggtcgaag
gagtcgccgt cgtaaagctg ctgcacttac
gctggatgat gagcagatgg ctgcattatc
tgcttatgaa cgtggtcagc gttatgcaag
ttctgcgctg gctgatgcgg aaaatatttc
cgccaaattg cctaaatcag ttgttgctct
gtcaggtgat gcacttcaaa aagcctttac
atctaaccit catgagcaga aaaaagctgg
tcttttaact tctgtgctta aaacgtcatc
tcagtttgct cctggagcga cagtattgta
caggtctcgt gttccaactg agtgtataga

15480 gtattttgct taccaaatac agcaatagta
15540 aaattcggga tgcctgggga agcatggttc
15600 ttggtaaagg tcagatccgg atgagaactg
15660 caactgggtgc ctggagaaat gctctttcta
15720 atcgtctgat taaaccacgc tgggagatta
15780 acatacgctc aatactcaac cggttgaaga
15840 ggtggattcg ttaattgcgc gcgtaggagt
15900 tgtatgtggt cgggatgtga agtttactct
15960 gacctctcgg gtatggtcag gtaatgaacg
16020 ggatgatctc atcccttctt ttctactgac
16080 agtatctggt gtcataaaaa ttgccgatgg
16140 cgaaagtgat tatcgtgttc tggttggcga
16200 cagattgggt aacgattatc gccaacaag
16260 ccgattgcag aatgaatttg ctggaaatat
16320 acgtaagatt attacccgct gtatcaacac
16380 tttttctcac cccgggtgaac tatctgcccc
16440 agataaagag gaattactta agcagcaggc
16500 ggtgatattt gaagctgaag aagttatcac
16560 tgcataaga actagtttaa gctcacgaca
16620 taaggcgat aaaatgggtgc ttaacctgga
16680 gaaaattgag gccattctta aggaacttga

aaagccagca ccctgatgcg accacgtttt
cctttgttac aggccagaaa gcataactgg
acttgatcg tcggtctgat aatcagactg
gattattagt ctgggaccac ggtcccactc
cacggtccca ctcgatatcg cggtctgata
cgtcggtctg attattagtc tgggaccatg
gtctgggacc acggtcccac tcgtatcgtc
cactcgatc gtcggtctga ttattagctt
tgattattag tctgggacca cgatcccact
ccacggtccc acttgatttg tcgatcagac
cctgtcaagg gcaagtattg acatgtcgtc
gcggttgtat gcctgctgtg gattgctgct
cggttatgtg gacaaaatac ctggttacct
tccgatgcaa gtgtgtcgct gtcgacgagc
ttcagtgtcg ctgatttgta ttgtctgaag
ttaatacgat acctgcgtca taattgatta
ttgtgatatg tagatgataa tcattatcac
ttacggggcg gcgacctcg gcgttttcgc
ttccgttctt cttcgtcata acttaatgtt
aaacgacagg tgctgaaagc gagctttttg
ccgtggaatg aacaatggaa gtccgagctc

16740 agtctacgtt tatctgtctt tacttaatgt
16800 cctgaatatt ctctctgggc ccactgttcc
16860 ggaccacggt cccactcgta tcgtcggtct
16920 gtatcgtcgg tctgattatt agtctgggac
16980 atcagactgg gaccacggtc ccactcgat
17040 gtcccactcg tatcgtcggt ctgattatta
17100 ggtctgatta ttagtctgga accacgggtcc
17160 gggaccacgg tcccactcgt atcgtcggtc
17220 cgtgttgtcg gtctgattat cggtctggga
17280 tatcagcgtg agactacgat tccatcaatg
17340 gtaacctgta gaacggagta acctcggtgt
17400 gtgtcctgct tatccacaac attttgcgca
17460 aggccgtgcc ggcacgttaa ccgggctgca
17520 tcgcgagctc ggacatgagg ttgccccgta
17580 ttgtttttac gttaagttag tgcagatcaa
17640 ttgacgtgg ttgatggcc tccacgcacg
17700 ttacgggtc ctttccggtg atccgacagg
17760 tatttatgaa aattttccgg ttaaggcgt
17820 tttatttaaa ataccctctg aaaagaaagg
17880 gcctctgtcg tttcctttct ctgtttttgt
17940 atcgctaata acttcgtata gcatacatta

tacgaagtta tattcgatgc ggcgctgagg
ataccaggcc tgaatcgccc catcatccag
agctttgttg taggtggacc agttggtgat
tgcgttgctg ggaagatgcg tgatctgac
acaaagccac gtgtctcaaa atctctgatg
atgaacaata aaactgtctg cttacataaa
tcaacgggaa acgtcttgct cgacgatgat
atatgctaaa acgcggcata ccccgctat
ggcaatgaaa gacggtgagc tggatgatg
ccatgagcaa actgaaacgt tttcatcgct
gtttctacac atatattcgc aagatgtggc
taaagggttt attgagaata tgttttctg
ttttgattta aacgtggcca atatggacaa
atattatacg caaggcgaca aggtgctgat
ttgtgatggc ttccatgtcg gcagaatgct
gcagggcggg gcgtaatttt ttttaaggcag
cgctgaata agtgataata agcggatgaa
atgagaattg gtcgacggcc cgggcggcta
19040

18000 tctgcctcgt gaagaagggtg ttgctgactc
18060 ccagaaagtg agggagccac ggttgatgag
18120 tttgaacttt tgctttgcca cggaacggtc
18180 cttcaactca gcaaaagttc gatttattca
18240 ttacattgca caagataaaa atatatcatc
18300 cagtaatata aggggtgtta tgagccatat
18360 aagctgtcaa acatgagaat tgggtcgtca
18420 tcccactagt taatcgtagc aattccgtat
18480 ggatagtgtt cacccttggt acaccgtttt
18540 ctggagtgaa taccacgacg atttccggca
18600 gtgttacggt gaaaacctgg cctatttccc
18660 ctacagccaat ccctgggtga gtttcaccag
18720 cttcttcgcc cccgttttca ccatgggcaa
18780 gccgctggcg attcaggttc atcatgccgt
18840 taatgaatta caacagtact gcgatgagt
18900 ttattggtgc ccttaaacgc ctggttgcta
18960 tggcagaaat tcgatgataa gctgtcaaac
19020 gataatacga ctactatag

【서지사항】

【서류명】 명세서 등 보정서
 【수신처】 특허청장
 【제출일자】 2002.12.31

【제출인】

【성명】 이영민
 【출원인코드】 4-2002-037468-5
 【사건과의 관계】 출원인

【대리인】

【성명】 이원희
 【대리인코드】 9-1998-000385-9
 【포괄위임등록번호】 2002-075574-2

【사건의 표시】

【출원번호】 10-2002-0061589
 【출원일자】 2002.10.09
 【심사청구일자】 2002.10.09
 【발명의 명칭】

일본뇌염 바이러스의 신규한 전체-길이의 게놈 R N A 및 상 기 J E V 게놈 R N A에 대한 감염성이 있
 는 J E V c D N A

【제출원인】

【접수번호】 1-1-02-0331891-89

【접수일자】 2002.10.09

【보정할 서류】 명세서등

【보정할 사항】

【보정대상항목】 별지와 같음

【보정방법】 별지와 같음

【보정내용】 별지와 같음

【취지】

특허법시행규칙 제13조·실용신안법시행규칙 제8조의 규
 정에의하여 위와 같 이 제출합니다. 대리인
 이원희 (인)

020061589

출력 일자: 2003/10/17

【수수료】

【보정료】 5,000 원

【추가심사청구료】 0 원

【기타 수수료】 0 원

【합계】 5,000 원

【보정대상항목】 식별번호 42

【보정방법】 정정

【보정내용】

【표 1】

위치	연도	군주	출처(source)	진행크 기탁번호
오스트레일리아	1995	FU	인간 혈청	AF217620
중국	1954	SA14	모기	U14163
		SA14-14-2	SA14 유도체	AF315119
		SA14-12-1-7	SA14 유도체	AF416457
		SA14-2-8	SA14 유도체	U15763
		SA(V)	SA14 유도체	D90194
		SA(A)	SA14-14-2 유도체	D90195
	1949	Beijing-1	인간의 뇌	L48961
인도	1949	P3	모기	U47032
	1973	GP78	인간의 뇌	AF075723
	1953	Vellore P20778	인간의 뇌	AF080251
일본	1982	Ja0 ArS982	모기	M18370
	IU	Ishikawa	IU	AB051292
	1959	JaG Ar01	모기	AF069076
한국	1994	K94P05	모기	AF045551
	1987	CNU/LP2	모기	본 발명
대만	1997	T1P1	모기	AF254453
	1994	CH2195LA	CH2195 유도체	AF221499
	1994	CH2195SA	CH2195 유도체	AF221500
	1990	CH1392	모기	AF254452
	1985	RP-2ms	모기	AF014160
	1985	RP-9	모기	AF014161
	1965	Ling	인간의 뇌	L78128
	IU	YL	IU	AF486638
	IU	TC	모기	AF098736
	IU	TL	모기	AF098737
	IU	HVI	모기	AF098735

【보정대상항목】 식별번호 45

【보정방법】 정정

【보정내용】

【표 2】

분리주	% 서열 상동성 ^a																													
	Ishikawa	K94P05	FU	CH2185LA	CH2186SA	RP-2ms	RP-9	CH1392	TIP1	YL	JaGAR01	HV	TC	TL	Beijing-1	Ling	Yellow P20778	p3	SA14-14-2	SA(A)	SA14-12-1-7	SA14-2-8	SA14	SA(V)	CNU/LP2	GP78	JaGAR582	WNV		
Ishikawa	97.0	90.1	88.3	88.3	88.9	89.0	89.1	89.1	88.9	89.2	89.0	88.9	88.8	88.9	88.8	88.8	88.8	89.1	88.8	88.9	88.9	89.1	89.2	89.2	89.0	88.8	88.9	89.0		
K94P05	97.7	89.6	88.6	88.6	88.9	89.2	89.3	89.4	89.4	89.1	89.5	89.2	89.1	89.0	89.0	89.0	89.0	89.4	89.1	89.2	89.2	89.3	89.5	89.5	89.1	89.0	89.5	89.7		
FU	97.7	97.0	88.9	88.9	89.3	89.4	89.4	89.4	89.2	89.6	89.4	89.2	89.1	89.3	89.0	89.1	89.4	89.1	89.2	89.2	89.3	89.6	89.6	89.3	88.7	89.4	89.5			
CH2185LA	97.7	97.0	89.9	89.9	89.2	89.3	89.3	89.3	89.1	89.5	89.2	89.1	89.0	89.0	89.0	89.0	89.4	89.1	89.2	89.2	89.3	89.6	89.6	89.3	88.7	89.4	89.5			
CH2186SA	97.1	96.5	99.0	99.0	96.3	96.3	96.3	96.3	96.1	96.5	96.2	95.9	95.8	95.6	95.7	95.1	96.3	96.6	96.7	96.7	96.9	97.1	97.1	95.9	95.7	97.3	89.5			
RP-2ms	97.5	96.8	99.4	99.4	98.8	99.9	99.5	99.5	99.3	99.4	98.8	98.2	98.1	97.2	97.1	96.6	97.9	98.0	98.1	98.1	98.3	98.5	98.5	97.1	96.9	97.7	89.4			
RP-9	97.6	96.9	99.5	99.5	98.9	99.7	99.6	99.5	99.3	99.5	98.8	98.2	98.2	97.2	97.2	96.7	98.0	98.1	98.1	98.1	98.3	98.5	98.5	97.2	96.9	97.8	89.4			
CH1392	97.8	97.2	99.7	99.7	99.1	99.6	99.7	99.9	99.5	99.7	99.0	98.3	98.3	97.3	97.3	96.8	98.2	98.2	98.3	98.3	98.4	98.6	98.6	97.3	97.0	97.9	89.4			
TIP1	97.5	96.8	99.3	99.3	98.7	99.1	99.2	99.4	99.5	99.7	99.0	98.3	98.3	97.3	97.3	96.8	98.1	98.2	98.2	98.3	98.4	98.6	98.6	97.3	97.0	97.8	89.4			
YL	97.4	96.7	99.2	99.2	98.7	99.1	99.2	99.4	99.0	99.4	98.8	98.1	98.0	97.1	97.1	96.5	97.9	98.0	98.0	98.0	98.0	98.2	98.4	98.4	97.0	96.8	97.6	89.2		
JaGAR01	97.1	96.4	98.9	98.9	98.2	98.7	98.3	99.1	98.6	98.7	99.1	98.4	98.4	97.4	97.4	96.9	98.3	98.3	98.4	98.4	98.5	98.8	98.8	97.4	97.1	98.0	89.5			
HV	97.2	96.5	98.9	98.9	98.3	98.8	98.3	99.1	98.7	98.8	98.7	98.6	98.4	97.2	97.2	96.7	98.1	98.1	98.1	98.1	98.3	98.5	98.5	97.1	96.9	97.7	89.4			
TC	97.0	96.4	98.8	98.8	98.2	98.7	98.3	99.0	98.6	98.5	98.2	98.4	99.0	97.2	97.1	96.4	97.7	97.8	97.9	97.9	98.1	98.3	98.3	96.9	96.7	97.4	89.5			
TL	97.2	96.6	99.0	99.0	98.4	98.9	98.9	99.2	98.8	98.7	98.4	98.5	99.7	97.0	96.8	96.1	97.5	97.6	97.7	97.7	97.9	98.1	98.1	96.7	96.5	97.2	89.3			
Beijing-1	97.3	96.6	99.0	99.0	96.5	98.9	99.0	99.2	98.8	98.7	98.4	98.6	99.2	99.3	99.1	96.7	97.4	97.2	97.2	97.3	97.5	97.6	97.6	96.4	96.1	97.0	89.5			
Ling	97.4	96.7	99.1	99.1	98.6	99.0	99.1	99.3	98.9	98.9	98.6	98.7	99.0	99.2	99.2	96.7	97.3	97.1	97.2	97.2	97.4	97.6	97.6	96.3	96.2	97.2	89.5			
Yellow P20778	97.7	97.1	99.5	99.5	98.9	99.4	99.5	99.7	99.3	99.2	98.9	99.1	99.1	99.2	99.3	99.4	96.8	96.6	96.7	96.7	96.9	97.1	97.1	96.0	95.6	96.4	89.5			
p3	97.8	97.1	99.5	99.5	98.8	99.4	99.5	99.7	99.4	99.3	99.0	99.2	99.0	99.2	99.2	99.5	99.8	98.2	98.3	98.3	98.5	98.7	98.7	97.1	97.1	97.8	89.5			
SA14-14-2	97.9	97.1	99.5	99.5	98.9	99.3	99.4	99.7	99.2	99.2	98.9	99.0	98.8	99.0	99.1	99.2	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.4	99.4	99.4	97.4	97.3	89.1	89.4		
SA(A)	97.1	96.6	98.8	98.8	98.2	98.7	98.8	99.0	98.6	98.5	98.2	98.3	98.1	98.3	98.4	98.5	98.9	98.9	98.9	98.9	99.6	99.4	99.4	98.4	97.5	97.4	98.2	89.4		
SA14-12-1-7	97.2	96.8	98.9	98.9	98.3	98.7	98.9	99.1	98.7	98.8	98.3	98.4	98.2	98.4	98.5	98.6	99.0	99.0	98.9	99.7	99.4	99.5	99.5	97.5	97.4	98.2	89.4			
SA14-2-8	97.7	97.3	99.4	99.4	98.8	99.3	99.4	99.6	99.2	99.2	98.8	98.9	98.8	98.9	99.0	99.2	98.5	99.6	99.5	99.1	99.2	99.6	99.6	97.7	97.6	98.3	89.5			
SA14	97.5	96.7	99.0	99.0	98.4	98.9	99.0	99.2	98.9	98.8	98.6	98.7	98.4	98.5	98.6	98.7	99.1	99.2	99.2	99.5	99.5	99.2	99.9	97.9	97.8	98.6	89.6			
SA(V)	97.3	96.8	98.9	98.9	98.3	98.7	98.9	99.1	98.7	98.6	98.4	98.5	98.2	98.4	98.5	98.6	98.9	99.0	99.0	99.0	99.0	99.0	99.0	97.9	97.8	98.6	89.6			
CNU/LP2	97.4	96.7	98.9	98.9	98.2	98.7	98.8	99.1	98.6	98.6	98.2	98.4	98.2	98.4	98.6	98.6	98.9	99.0	99.0	98.4	98.4	99.0	98.6	98.5	95.3	97.1	89.6			
GP78	97.0	96.4	98.6	98.6	98.0	98.5	98.8	98.8	98.5	98.4	98.0	98.1	98.0	98.2	98.3	98.3	98.7	98.7	98.7	98.7	98.1	98.2	98.2	98.2	97.2	97.2	89.6			
JaGAR582	97.6	96.8	97.8	97.8	97.2	97.7	97.8	98.0	97.8	97.6	97.2	97.3	97.1	97.3	97.4	97.5	97.9	98.0	97.3	97.4	97.9	97.6	97.4	97.5	97.1	97.1	89.6			
WNV	76.2	75.8	76.6	76.6	76.1	76.4	76.5	76.7	76.5	76.5	76.3	76.4	76.1	76.2	76.3	76.4	76.6	76.6	76.8	76.2	76.3	76.7	76.6	76.5	76.4	76.5	76.7			

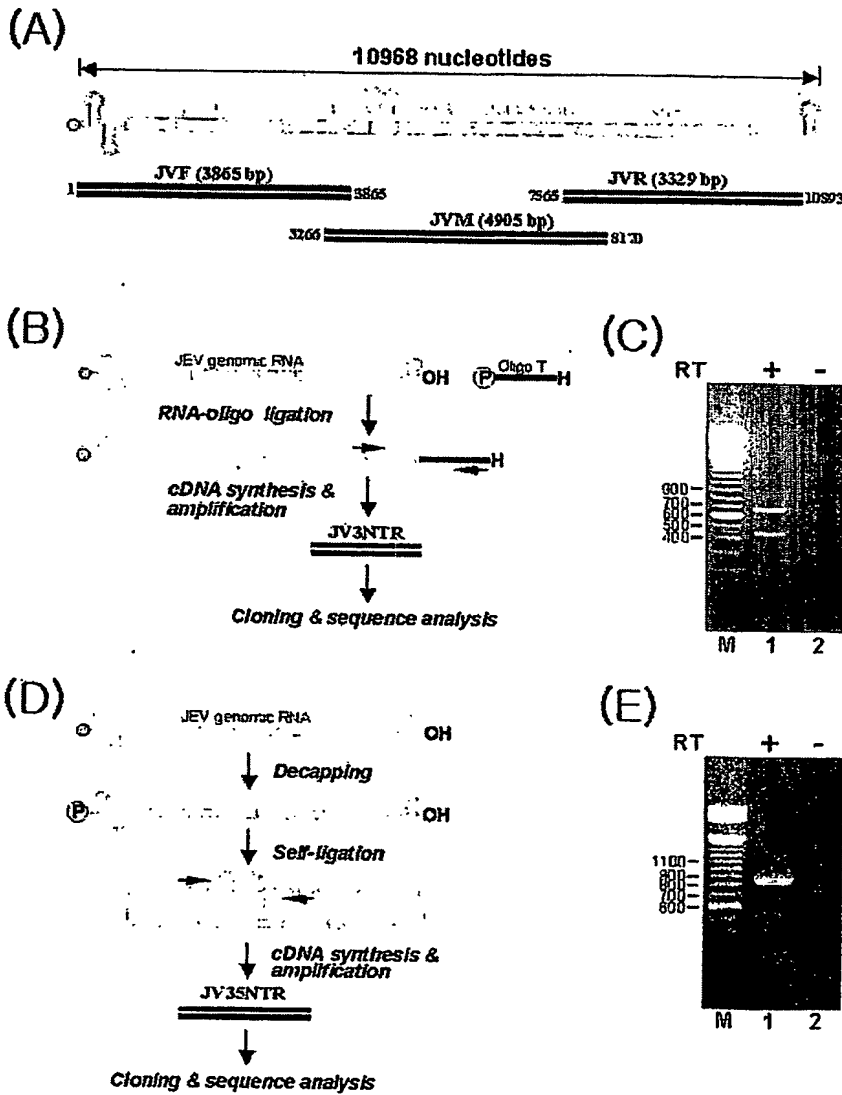
^a 완전한 계통의 % 뉴클레오타이드 서열 상동성은 오른쪽 위에 나타내었다. 완전한 계통의 % 아미노산 상동성은 왼쪽 아래에 나타내었다. CNU/LP2와의 % 서열 상동성은 굵은 글씨로 나타내었다.

【보정대상항목】 도 2

【보정방법】 정정

【보정내용】

【도 2】



BEST AVAILABLE COPY